

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
MADRE DEL TEJIDO ADIPOSEO
PROCEDENTES DE INDIVIDUOS
OBESOS**

TESIS DOCTORAL

LAURA MARTÍN PÉREZ

MADRID, 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSO PROCEDENTES DE INDIVIDUOS OBESOS

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Laura Martín Pérez,
Licenciada en Biología

Director de Tesis:
Dra. Beatriz González Gálvez

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III – ISCIII**



Doña **Beatriz González Gálvez**, investigadora principal en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) del Instituto Carlos III de Madrid, CERTIFICA que:

Doña **Laura Martín Pérez**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de León, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSEO PROCEDENTES DE INDIVIDUOS OBESOS”**

y considera que el trabajo realizado reúne todas las condiciones requeridas así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firma la presente en Madrid a 3 de Septiembre del 2014.

Vº Bº Director de la Tesis

Fdo. Beatriz González Gálvez
Directora de la tesis doctoral

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, Beatriz González, por darme la oportunidad de alcanzar mis metas y apoyarme siempre en todo lo que he deseado hacer. Gracias a tu apoyo y tus consejos he aprendido tantas cosas estos años que no tengo palabras suficientes...pero sobre todo gracias por hacer que hoy tenga tanta confianza en mí misma.

A mis tutores en el centro, Antonio Bernad y Kenneth McCreath, por el tiempo dedicado en las comisiones de tesis, sus consejos, sus ideas y su constante apoyo. Al departamento que me ha enseñado que todo se puede conseguir...

Llegar a un sitio nuevo es difícil, pero he tenido la suerte de contar con grandes compañeros en el laboratorio. Quiero agradecer a todos ellos los buenos consejos que me habéis dado, la ayuda y el gran apoyo que me habéis brindado y sobre todo los buenos momentos que hemos vivido. A Ana, por todas las risas que hemos compartido y a Susana, por los grandes momentos que hemos pasado (y me quedo tan "pansha"!). A Rosemery por ser como eres, no cambies nunca y perdón por salir tanto a la escalera a coger "aire". Diego, porque he recordado que los "cazurros" son grandes amigos y compañeros. A Juan y Marta por esas comidas de historietas y risas, por los consejos y por estar siempre cuando se os necesita. Gracias a todo el programa por hacer del laboratorio mi casa.

A Yáima y Juan Carlos porque me acogisteis, me aconsejasteis y os convertisteis en grandes amigos. Os echo mucho de menos y espero que no dejéis nunca de contar conmigo para lo que necesitéis.

A Nuria y Beita, por hacer que el grupo BGG fuera el mejor. Nuria gracias por tu paciencia y por enseñarme todo lo que sé, trabajar contigo ha sido lo mejor (atrapar ratoncillos y sacar grasa a full inunca será lo mismo!). Beita, la niña del grupo, gracias por tu alegría, tus consejos, por estar siempre que te he necesitado y porque la vida en rosa se ve de otra manera!. Os echo tanto de menos...

¡A mis chicas! Aurora, qué puedo decirte que no te haya dicho ya, has sido mi mejor compañera, mi gran apoyo, pero sobre todo mi gran amiga en estos años. Gracias por tus consejos, tu constancia, y sobre todo por tu amistad, illevarme una amiga como tú no tiene precio! "You know...I wanna make you happy!" María, hiciste que San Paco fuera una de mis mejores decisiones. Gracias por convencerme, por aguantar mis desatinos con la rubia, por socorrerme en los malos momentos y sobre todo por tu ayuda en esta tesis. Busquemos el próximo destino...Chicas, los quiero!

Fran, nunca olvidaré tu primera frase "No he venido aquí para hacer amigos" pero definitivamente me llevo a uno de los mejores y sabes que siempre puedes contar conmigo. Gracias por ser como eres y por tu confianza. ¡Te quiero mucho Fran!

A Nika, porque desde que empezó esta andadura en la ciencia has sido siempre un apoyo constante. Desde el principio de la biología hasta el final de la biomedicina, lo estamos consiguiendo...

Por supuesto a mi gente. Chupe por tu compañía en los grandes viajes, no serían grandes si no hubieras estado ahí. Dani, porque el "p-infierno y las polaroids" nos unieron, y con tus idas y venidas vas haciendo que el día a día sea mejor. Noemí que cruzaste el charco por entrar en el país al que nunca irías sólo por verme...Rebe de peque a los conciertos!, gracias por aguantarnos...

Gracias a todos con los que en algún momento he compartido pequeños y grandes conciertos...

No me puedo olvidar de mi "malaguíta", Ruth, porque siempre encontraremos un momento para que todo siga igual...desde Portillo a Granada pasando por Madrid y Málaga siempre serás mi "Carpe Diem".

Víctor, esperar siempre tiene su recompensa y al final mereció la pena...

Quiero dar las gracias especialmente a mis padres por su apoyo, no solo estos años, sino durante toda mi vida. A ellos tengo que agradecerles ser quien soy, permitirme realizar mis sueños y apoyarme en todas las decisiones que he tomado. Os quiero y sois mi gran apoyo.

A Luisa, mi amiga, confidente y hermana, porque cada vez que algo ha ido mal siempre estabas a mi lado intentándome ayudar...Nunca me dejaste sola y me enseñaste a disfrutar lo bueno. Sea en Bruselas, Marsella o Madrid "The best is yet to come".

A mis niñas, Aínara y Sheila, porque son lo más preciado que tengo. ¡Nunca olvidéis que todo se puede conseguir!

RESUMEN

RESUMEN

El tejido adiposo es una de las principales fuentes de células madre (ASC). Este subtipo celular cuenta con propiedades características de las células madre mesenquimales: son pluripotentes y se autorenewan, pero además son fáciles de aislar. Sin embargo, en el presente trabajo se ha demostrado, que el ambiente en el cual residen las células madre puede dar lugar a cambios morfológicos y funcionales, afectando a las principales propiedades de estas células.

El tejido adiposo en situaciones de obesidad presenta un aumento en la producción de distintos factores inflamatorios, por lo que las células residentes se encuentran en un ambiente de inflamación crónica. Se ha observado que las ASCs de ambientes obesos mantienen la propiedad de diferenciarse a otros tejidos, pero tienen afectada la capacidad de formar adipocitos funcionales, ya que presentan un fenotipo de resistencia a la insulina.

Otra de las propiedades que se ha visto afectada por la obesidad es la capacidad regenerativa de estas células, las ASCs de obesos presentan una disminución en la capacidad de proliferación, migración y angiogénesis por lo que son menos capaces de alcanzar y reparar la diana cuando se usan en terapia celular. Además hemos constatado que en condiciones de obesidad las ASCs presentan un aumento del número de mitocondrias asociado a un aumento en la cantidad de ROS producido en el cultivo de las células. Asimismo, se ha observado que las mitocondrias de las células obesas son capaces de respirar mejor en presencia de ácidos grasos pero utilizan peor la glucosa que las células de ambientes no obesos.

Por otro lado, la obesidad origina inestabilidad genética, ya que el incremento de ROS lleva asociado un acortamiento telomérico y un cambio en el estado de hidroximetilación del ADN, así como una alteración en los niveles de p21 y p53. Estos cambios pueden explicar la disminución en la capacidad multipotente y de auto-renovación de las ASC de obesos. Finalmente los altos niveles de glucosa en el medio y la disminución de su captación confirman que las ASCs obesas presentan una alteración en el metabolismo que desencadena la resistencia a la insulina.

La obesidad es una patología que conlleva una disfunción metabólica en el individuo que es adquirida por las células madre del tejido adiposo. Por lo tanto la funcionalidad de las células madre para su uso en terapias celulares está disminuida, siendo necesario aumentar los controles aplicados actualmente en clínica en la selección de células para su uso en terapias celulares.

SUMMARY

Adipose tissue is a major source of stem cells (ASC). This subtype of stem cells exhibits properties typical of the mesenchymal stem cells (MSC): they are pluripotent and self-renewal, but also they are easy to isolate. However, in this study it has been shown that the environment where the stem cells reside can lead to morphological and functional changes, disturbing the main properties of these cells. Obese ASCs have an increased production of different inflammatory factors, so the cells are in a high inflammatory environment. It has been observed that obese ASCs maintain the ability to differentiate into other tissues, but have an impaired ability to form functional adipocytes, and they present an insulin-resistant phenotype.

We have shown that the regenerative capacity of these cells is also affected by obesity. Obese ASCs have reduced ability to proliferate, migrate and form tubular structures, so then they are less capable of reaching and repairing the target when they are used in cell therapy. It has been found that in obese conditions ASCs have an increased mitochondria number associated with an increase in ROS production during cell culture. Furthermore, it has been observed that mitochondria from obese ASCs are able to use better fatty acids than glucose as carbon source in the respiration process than nonobese ASCs. Moreover, obesity induces genetic instability, since the increase of ROS has associated a telomere shortening and a change in the DNA hydroxymethylation state as well as changes in p21 and p53 expression levels. These changes can explain the reduction of self-renewal and multipotency capacities in obese ASCs. Finally, high levels of glucose in the medium and a decrease in the glucose uptake confirm that obese ASCs have an insulin-resistant phenotype.

Obesity is a condition that leads to metabolic dysfunction in the subject, and this dysfunction is acquired by the stem cells from adipose tissue. Therefore, the functionality of stem cells for their use in cell therapy is diminished, and it is necessary to increase controls applied in the selection of cells for use in cellular therapies.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	29
1. La obesidad	31
1.1. La Obesidad. Concepto y Clasificación.....	31
1.2. Cambios fisiológicos y metabólicos.	32
1.3. Problemas asociados a la obesidad.	34
2. Tejido Adiposo	35
2.1. Biología del tejido adiposo.....	35
2.2. Tejido adiposo blanco.....	36
2.2.1. Componentes del tejido adiposo blanco.	37
2.2.2. Metabolismo del tejido adiposo blanco.	38
2.2.3. Tejido adiposo blanco como órgano endocrino.....	40
2.2.4. Fisiología del tejido adiposo blanco en el desarrollo de la obesidad.....	41
2.3. Tejido adiposo marrón.....	43
3. Células madre adultas.	44
3.1. Propiedades de las células madre adultas.....	44
3.2. Células madre del tejido adiposo (ASC).	45
3.2.1. Características de las ASC.....	46
3.2.2. Aplicaciones terapéuticas.	47
3.2.3. Consecuencias de las patologías sobre las poblaciones ASC. .	48
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Cultivos celulares.....	57
1.1. Líneas celulares.	57
1.2. Obtención de células: técnica del explante.....	57
1.3. Condiciones del cultivo.	58
1.4. Caracterización celular.	58
2. Estudio de diferenciación	58
2.1. Diferenciación in vitro.	58

2.1.1. Diferenciación adipogénica.....	59
2.1.2. Diferenciación osteogénica.....	59
2.1.3. Diferenciación condrogénica.....	59
3. Estudios de funcionalidad	60
3.1. Ensayo de migración por transwell.	60
3.2. Ensayo de migración por “Wound healing”.	60
3.3. Ensayo de invasión.	60
3.4. Ensayo de angiogénesis.....	60
4. Análisis de la proliferación y la apoptosis del cultivo celular.....	61
4.1. Curva de crecimiento celular	61
4.2. Valoración de la apoptosis en el cultivo	61
5. Estudio metabólico.....	61
5.1. Medida de la captación celular de glucosa.	61
5.2. Medida de lipólisis.	62
5.3. Cuantificación de la producción de citoquinas.	62
5.4. Análisis mitocondrial.	62
5.4.1. Detección y cuantificación de mitocondrias.....	62
5.4.2. Generación de ROS.	63
5.4. Detección de la acidificación del medio y el consumo de oxígeno.	63
5.5. Análisis metabólico extra e intracelular.....	64
5.5.1. Obtención de los extractos	64
5.5.2. Análisis de metabolitos por cromatografía	64
6. Estudio telomérico	65
6.1. mFISH (“ <i>metaphase Fluorescence In Situ Hybridization</i> ”).	65
6.1.1. Preparación de las muestras.	65
6.1.2. Desnaturalización/hibridación in situ.....	66
6.1.3. Captura de imágenes.	66
6.1.4. Cuantificación de fluorescencia telomérica.	66
6.2. Análisis de la actividad telomerasa - ensayo TRAP.	66
6.2.1. Amplificación telomérica.	67
6.2.2. Cuantificación de la amplificación telomérica.....	67
7. Estudio de expresión génica	68
7.1. Aislamiento de ARN.....	68
7.2. RT-PCR.....	68
7.3. qRT-PCR.....	68
8. Western blot.....	70
8.1. Aislamiento y cuantificación proteica.	70

8.2. Electroforesis, transferencia, incubaciones y revelado.....	70
9. Hidroximetilación del ADN	71
9.1. Aislamiento de ADN.....	71
9.2. Inmunodetección de grupos 5hmc.	71
10. Estudio de recuperación metabólica	72
10.1. Aislamiento de la fracción citosólica.	72
10.2. Transferencia de fracciones.....	72
11. Estudio estadístico.....	73
 RESULTADOS	 75
1. Aislamiento y caracterización de ASC de tejido adiposo.....	77
1.1 Caracterización fenotípica.	77
2. Estudio de la capacidad de diferenciación de las ASC.....	78
2.1. Propiedades metabólicas de los adipocitos derivados de las ASCs.....	79
2.1.1. Formación de vesículas en las ASCs.....	79
2.1.2. Deterioro en la captación de glucosa en las ASCs de obesos. .	80
2.1.3. Perfil de secreción de citoquinas alterado en las oASCs.	81
2.1.4. Recuperación del fenotipo mediante transferencia citosólica....	82
3. Efecto de la obesidad en la funcionalidad de las células madre de tejido adiposo ..	84
3.1. La obesidad reduce la capacidad de migración de las ASCs.....	84
3.2. La obesidad no afecta a la capacidad de invasión de las ASCs.	87
3.3. La obesidad disminuye la capacidad de angiogénesis en las ASCs.	90
4. Estudio del efecto de la obesidad sobre la viabilidad de las ASC.....	91
4.1. La obesidad provoca una disminución en la proliferación de las ASCs en el cultivo celular.....	91
4.2. Las ASCs de ambientes obesos presentan mayor tamaño celular.	93
4.3. Incremento de la apoptosis en durante el cultivo de las ASCs.....	93
5. Efecto de la obesidad sobre el metabolismo celular de las ASCs.	94
5.1. Las ASCs de individuos obesos presentan un mayor contenido mitocondrial.....	94
5.2. Las ASCs de individuos obesos producen mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno en el cultivo celular.	96
5.3. Efecto de la obesidad sobre el metabolismo de las ASC.	97
5.3.1. Metabolismo glucolítico.....	97
5.3.2. Metabolismo de los ácidos grasos.	98
5.4. Cambios metabólicos en las ASC.....	100
5.5. Respuesta alterada en condiciones de hipoxia en las ASC de obesos...	101

6. Estabilidad cromosómica de las ASC en cultivo.....	102
6.1. La obesidad aumenta el acortamiento telomérico de las ASCs in vitro..	102
7. Pérdida de la capacidad de auto-renovación de las ASCs de individuos obesos..	105
7.1. Hidroximetilación del ADN	105
7.2. La obesidad provoca una pérdida de la pluripotencia de las ASC durante el cultivo in vitro.....	106
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXOS.....	139

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

5hmC	5-hidroximetilcitosina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
ANGPTL2	Proteína 2 similar a la angiopoyetina, del inglés <i>Angiopoietin-related protein 2</i> , también conocida como <i>Angiopoietin-like protein 2</i> .
ANOVA	Análisis de la varianza, del inglés <i>Analysis of variance</i> .
AQP7	Acuoporina 7, del inglés <i>Aquaporin 7</i> .
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ASC	Células madre derivadas del tejido adiposo, del inglés <i>Adipose derived stem cells</i> .
BM-MSC	Células madre mesenquimales de la médula ósea, del inglés <i>Bone marrow mesenchymal stem cells</i> .
cASC	ASC derivadas de individuos no obesos.
CM	Quilomicrones, del inglés <i>Chylomicron</i> .
CMH I	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1.
CMH II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2.
CTL	Célula T citotóxica.
CXCL5	Quimiocina 5 de motivo CXC, del inglés <i>CXC motif chemokine 5</i> , también conocida como ENA-78.
DMEM	Medio completo modificado, del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> .
ECAR	Tasa de acidificación del medio, del inglés <i>Extra Cellular Acidification Rate</i> .
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, del inglés <i>Epidermal growth factor</i> .
EPC	Células progenitoras endoteliales, del inglés <i>Endothelial progenitor cells</i> .
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos, del inglés <i>Fatty acid binding proteins</i> .
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos, del inglés <i>Fatty acid transport protein</i> .
FBS	Suero fetal bovino, del inglés <i>Fetal bovine serum</i> .
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona, del inglés <i>Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine</i> .
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> .
FSC	Tamaño relativo, del inglés <i>Forward Scatter</i> .

GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4,
Glycerol-3P	Glicerol 3 fosfato, del inglés <i>Glycerol-3-phosphate</i> .
HDL	Lipoproteínas de alta densidad, del inglés <i>High density lipoprotein</i> .
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos, del inglés <i>Hepatocyte growth factor</i> .
HIF1α	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia, del inglés <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> .
HLA II	Antígeno leucocitario humano tipo II, del inglés <i>Human leukocyte antigen II</i> .
HMGB1	Proteína del grupo 1 de alta movilidad, del inglés <i>High-mobility group box 1</i> .
HSC	Células madre hematopoyéticas, del inglés <i>Hematopoietic stem cell</i> .
IFATS	Federación para terapias adiposas y ciencia, del inglés <i>Federation for Adipose Therapeutics and Science</i> .
IFN	Interferon.
IG	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina, del inglés <i>Insuline like growth factor</i> .
IL	Interleucinas.
IMC	Índice de masa corporal, del inglés <i>Body mass index</i> .
IR	Resistencia a la insulina, del inglés <i>Insulin resistance</i> .
LDL	Lipoproteínas de baja densidad, del inglés <i>Low density lipoproteins</i> .
LPL	Lipasa de lipoproteínas, del inglés <i>Lipoprotein lipase</i> .
LPS	Lipopolisacárido.
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1, del inglés <i>Monocyte chemotactic protein 1</i> , también conocida como quimoquina 2 (CCL2).
MSC	Células madre mesenquimales, del inglés <i>Mesenchymal stem cells</i> .
MYF5	Factor miogénico 5, del inglés <i>Myogenic factor 5</i> .
NAMPT	Nicotinamida fosforribosiltransferasa, del inglés <i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i> , también conocida como Visfatina
NEFA	Ácidos grasos no esterificados, del inglés <i>Non-esterified fatty acids</i> .
NK	Células “asesinas naturales”, del inglés <i>Natural Killer cell</i> .
NO	Óxido nítrico
oASC	ASC derivadas de individuos obesos.
OCR	Consumo relativo de oxígeno, del inglés <i>Oxygen Consumption Rate</i> .
OMS	Organización Mundial de la Salud.

PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1, del inglés <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> .
PDT	Tasa de duplicación celular, del inglés <i>Population doubling time</i> .
PECAM-1	Molécula de adhesión 1, del inglés <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> , también conocida como <i>CD31</i>
PGC-1	Coactivador 1 de PPAR.
PGE-2	Prostaglandina E2
PNA	Péptido de ácido nucleico, del inglés <i>Peptide Nucleic Acid</i> .
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas, del inglés <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> .
Q-FISH	Fluorescencia cuantitativa por hibridación in situ, del inglés <i>Quantitative Fluorescent in situ hybridization</i> .
RBP4	Proteína 4 de unión al retinol, del inglés <i>Retinolbinding protein 4</i> .
ROS	Especies reactivas del oxígeno, del inglés <i>Reactive oxygen species</i> .
SDF-1	Factor 1 derivado de células estromales, del inglés <i>Stromal derived factor 1</i> , también conocida como quimiocina CXC12 (CXCL12)
SFRP-5	Proteína 5 secretada similar al frizzled, del inglés <i>Secreted frizzled-related protein 5</i> .
SMA	Actina de musculo liso, del inglés <i>Smooth muscle actin</i> .
SSC	Complejidad interna, del inglés <i>Side Scatter</i> .
STRO-1	Precursor del antígeno estromal 1, del inglés <i>Stromalprecursor antigen-1</i> .
SVF	Fracción vascular del estroma, del inglés <i>Stromal vascular fraction</i> .
TAB	Tejido adiposo blanco.
TAM	Tejido adiposo marrón.
TET	Dioxigenasa de translocación de metilcitosinas, del inglés <i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase</i> .
TG	Triglicéridos.
TGF	Factor de crecimiento transformante, del inglés <i>Transforming growth factor</i> .
TNFα	Factor de necrosis tumoral alpha, del inglés <i>Tumor necrosis factor alpha</i> .
TRAP	Protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas, del inglés <i>Telomeric repeat amplification protocol</i> .
TSG	Proteína estimuladora del gen del factor de necrosis tumoral, del inglés <i>TNF-α-stimulated gene/protein</i> .

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés <i>Vascular endothelial growth factor</i> .
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad, del inglés <i>Very low density lipoprotein</i> .

INTRODUCCIÓN

1.LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial consecuencia de un desbalance positivo de energía mantenido y se desarrolla por la interacción del genotipo y el medio ambiente. Actualmente es considerada como un problema de salud pública ya que aumenta el riesgo de sufrir otras patologías, como enfermedades cardiovasculares (Lavie et al., 2009), la diabetes (Paneni et al., 2014) así como algunos cánceres atribuibles al sobrepeso y la obesidad (Calle and Thun, 2004). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud mundial. En España más del 50% de la población presentan sobrepeso u obesidad (Figura 1).

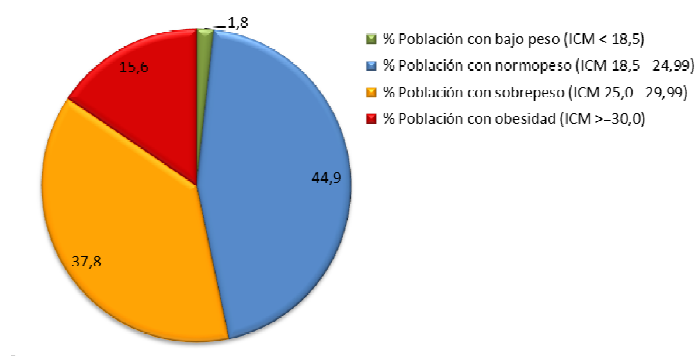


Figura 1. Distribución de la población española en función del IMC (Índice de masa corporal).

Hoy en día la obesidad está considerada una patología no solo de gran prevalencia sino también de gran impacto social. El estudio de esta patología se centra no solo en su epidemiología sino también es su fisiopatología, las complicaciones que llevan asociadas y los posibles tratamientos.

1.1. Obesidad. Concepto y clasificación.

La obesidad se define clínicamente como un aumento de peso corporal como consecuencia de una acumulación excesiva de tejido adiposo (Spiegelman and Flier, 2001). En condiciones normales la cantidad de tejido adiposo en el individuo varía entre un 15-18% en hombres y un 20-25% en mujeres. La obesidad se mide a través del índice de masa corporal (IMC), el cual expresa la razón entre el peso en kilogramos y su altura en metros elevada al cuadrado (Keys et al., 1972). La clasificación actual, de acuerdo con la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), establece grupos según los valores del IMC (Tabla 1).

VALORES LÍMITES DEL IMC	CLASIFICACIÓN
<18	Peso Insuficiente
18,5 – 24,9	Normo peso
25-26,9	Sobrepeso grado I
27- 29,9	Sobrepeso grado II
30 – 34,9	Obesidad tipo I
35 – 39,9	Obesidad tipo II
40- 49,9	Obesidad tipo III (mórbida)
>50	Obesidad tipo IV (extrema)

Tabla 1. Clasificación del Sobrepeso y la obesidad según el IMC (SEEDO 2000).

El IMC se utiliza frecuentemente para identificar el grado de obesidad de un individuo adulto. Hay que tener en cuenta que el valor obtenido de IMC no es constante, varía con la edad y el género, pero también depende de otros factores como la raza, la etnia y las proporciones de tejido muscular y adiposo.

Dentro de los tipos de obesidad, se han descrito otras clasificaciones que complementan al IMC existente en el individuo y sus consecuencias para la salud. Por ello se establecen tres grupos clásicos de obesidad; la androide (abdominal), la ginoide o periférica (parte inferior del cuerpo) y la de distribución homogénea (Allison and Heshka, 1993). Otras clasificaciones, disponen que en situaciones de obesidad se puede producir un aumento del número de células adiposas, obesidad hiperplásica, o un aumento del tamaño de los adipocitos, obesidad hipertrófica (Jo et al., 2009).

Existen además otros tipos menos conocidos en los que se ha observado la existencia de individuos con un peso normal pero que presentan un metabolismo alterado típico de pacientes obesos (*metabolically obese normal weight*) (Ruderman et al., 1998) o individuos con fenotipo obeso que presentan un metabolismo sano (*metabolically healthy obese*) (Karelis et al., 2005).

1.2. Cambios fisiológicos y metabólicos.

El desarrollo de la obesidad se produce cuando existe un aumento de la ingesta y/o una disminución del gasto energético. Cuando el balance es positivo, los ácidos grasos son almacenados en el tejido adiposo en forma de triglicéridos, incrementando así su tamaño. El adipocito, encargado del cúmulo de lípidos, se hipertrofia y se formarán nuevos adipocitos a partir de los preadipocitos estableciéndose una hiperplasia (Figura 2).

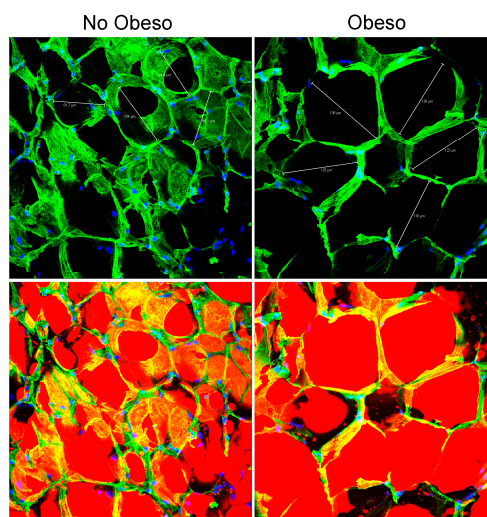


Figura 2. El tejido adiposo en condiciones no obesas y obesas. Con el desarrollo de la obesidad se produce una hipertrofia del adipocito incrementando su tamaño.

En el tejido adiposo la actividad adrenérgica está estimulada por la leptina (Figura 3). En muchos de los casos de obesidad existe una hiperleptinemia con resistencia a la acción de esta hormona de forma selectiva, disminuyendo su ingestión pero no su acción simpática, por lo que el individuo obeso presenta además efectos neuroendocrinos amplificados. Cuando en condiciones de obesidad el individuo presenta hipoleptinemia, donde la acción del receptor de la leptina está alterado, el gasto energético está disminuido y hay una desregulación en el control de la ingesta (Crowley et al., 2002).

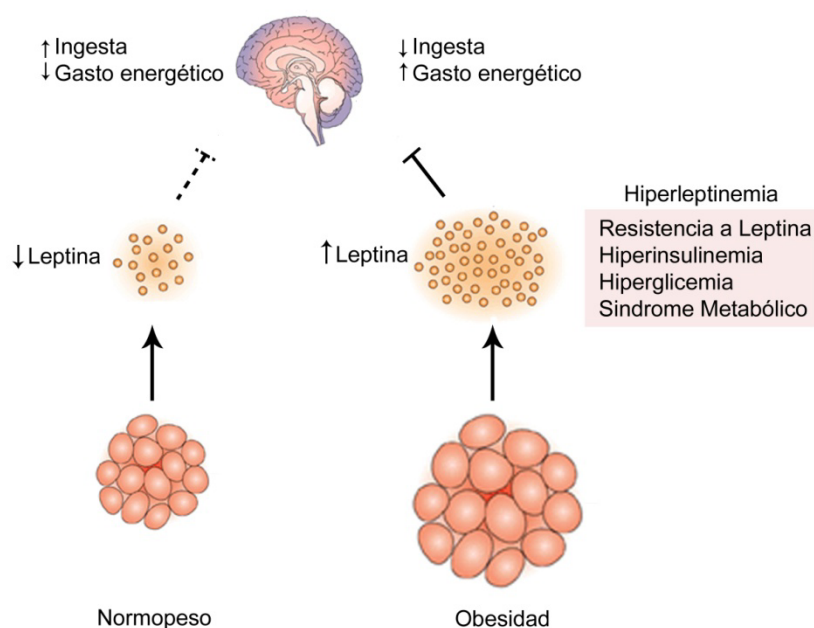


Figura 3. Efectos de la leptina en condiciones normales y de obesidad sobre la ingesta calórica y el gasto energético. Figura adaptada de Crowley y col. (Crowley et al., 2002).

1.3. Problemas asociados a la obesidad.

La obesidad predispone al individuo para el desarrollo de otras patologías como la artritis, trastornos metabólicos como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Felson et al., 1988, Mokdad et al., 2003). Con la obesidad se produce una alteración en la secreción de adipocinas secretadas por el tejido adiposo, así como un cambio en el estado inflamatorio que conducen al desarrollo de las distintas patologías asociadas (Figura 4) (Guilherme et al., 2008).

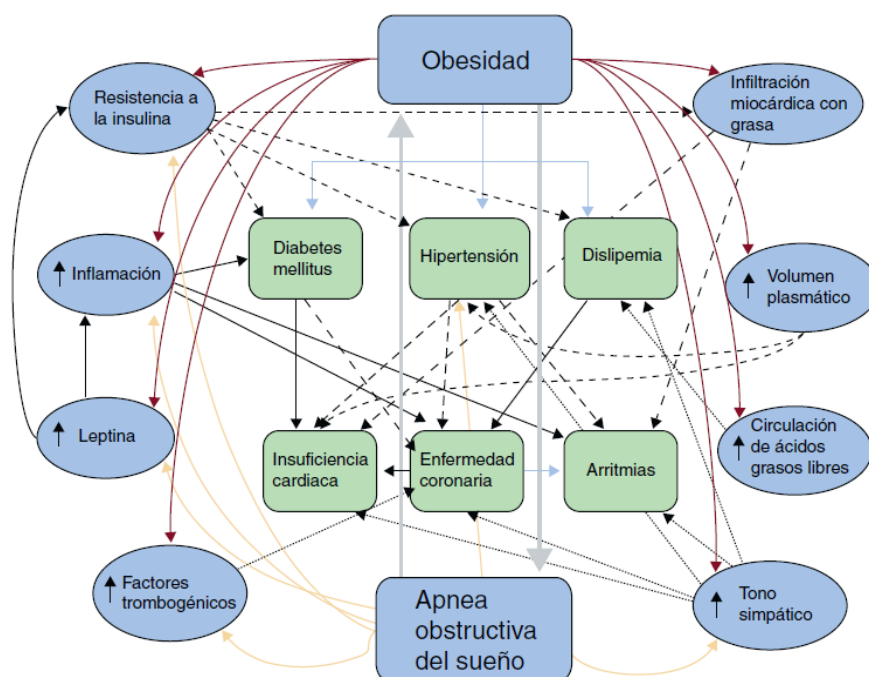


Figura 4. Fisiopatología de la obesidad y la interacción de los factores que actúan de forma indirecta en el desarrollo de las distintas patologías asociadas. Figura tomada de López-Jimenez y col. (López-Jiménez and Cortés-Bergoderi, 2011).

-Trastornos metabólicos. Diabetes. El tejido adiposo en obesidad presenta un estado inflamatorio en el que se liberan altos niveles de $\text{TNF-}\alpha$ y de IL-1 . Además los adipocitos hipertrofiados secretan grandes cantidades de MCP-1 (Skurk et al., 2007). Este aumento de citoquinas en el individuo incrementa la lipólisis y reduce el almacenaje de triglicéridos, lo que conduce a un aumento de los niveles de ácidos grasos en sangre y su acumulación en músculo e hígado, lo que causa la resistencia a la insulina (Unger, 2002).

- Enfermedades cardiovasculares. La obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y una frecuente asociación con otros factores de riesgo como la hipertensión, la diabetes o las variaciones en los niveles de colesterol. El incremento de la masa adiposa y su distribución eleva el

volumen de sangre circulante y el plasmático, provocando un aumento en el gasto cardiaco, que desencadena una dilatación de las cavidades cardiacas y finalmente una hipertrofia ventricular izquierda. Asimismo, la obesidad favorece la formación de coágulos acelerando la aterosclerosis y dificultando el flujo de sangre a los tejidos. Cuando este proceso se da en las arterias coronarias se produce la cardiopatía isquémica, provocando la muerte de las células cardiacas por falta de oxígeno y nutrientes (Van Gaal et al., 2006, Poirier and Eckel, 2002).

2. EL TEJIDO ADIPOSEO

Tradicionalmente no se ha prestado mucha atención al estudio del tejido adiposo debido a que éste era considerado un órgano de almacenamiento del exceso de energía. Actualmente, se considera no solo un órgano de almacenamiento, sino que se reconoce que tiene un papel clave en el mantenimiento e integración del metabolismo, ya que el tejido adiposo actúa como un órgano endocrino interviniendo en la homeostasis energética (Zhang et al., 1994).

2.1. Biología del tejido adiposo.

El tejido adiposo es un tejido de origen mesenquimal de tipo conjuntivo formado por la asociación de células que acumulan lípidos en su citoplasma llamadas adipocitos. Constituye entre el 15% y el 20% del peso corporal en los hombres y entre el 20% y el 25% en las mujeres y se encuentra ampliamente distribuido por el organismo. Este tejido por un lado se encarga de la protección y mantenimiento de los órganos internos, pero además es el encargado del almacenamiento de energía para el organismo y actúa como un órgano endocrino a través de la producción de diferentes citoquinas (adipoquinas) (Romacho et al., 2014).

En los mamíferos, el tejido adiposo está constituido por el conjunto de dos tipos, el tejido adiposo marrón (TAM) y el tejido adiposo blanco (TAB), ambos con función, morfología y distribución diferente (Figura 5).

El tejido adiposo blanco se encuentra distribuido a lo largo de todo el organismo. Los principales depósitos se encuentran en la zona visceral o intra-abdominal recubriendo los intestinos y la zona perirrenal y a nivel subcutáneo en los glúteos, muslos y abdomen. Además el TAB se puede localizar en el espacio orbitario, en el pericardio, en las extremidades y en la médula ósea. Las funciones específicas de cada depósito son diferentes, sin embargo son el visceral y el subcutáneo los mejor caracterizados por su importancia en la contribución en diversas enfermedades.

El tejido adiposo marrón aparece mayoritariamente en fetos y recién nacidos en la zona inter-escapular, para el mantenimiento del calor corporal. Con el desarrollo los acúmulos de TAM van desapareciendo, por lo que en el individuo adulto los depósitos se quedan restringidos a la zona cervical, supraclavicular y paravertebral.

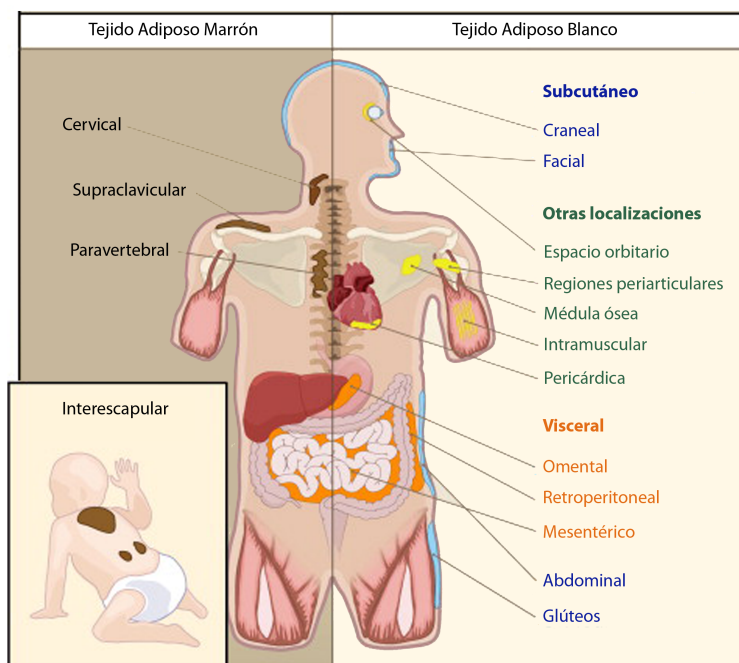


Figura 5. Distribución de los depósitos de tejido adiposo en humanos. Figura adaptada de Gesta y col.(Gesta et al., 2007).

2.2. Tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos que presentan una única vacuola lipídica (unilocular). Este tejido unilocular constituye el mayor componente del tejido adiposo en el organismo y se encuentra estratégicamente localizado en tres grandes áreas anatómicas; la zona subcutánea, la zona dérmica y la zona intra-peritoneal. Su función principal es la de regular la homeostasis energética del organismo. Actualmente, este tejido es reconocido como un órgano multifuncional, además de su función energética actúa como órgano endocrino (Kershaw and Flier, 2004) y como reservorio de células madre mesenquimales (MSC, del inglés “*Mesenchymal Stem Cells*”)(Zuk et al., 2002).

La acumulación del tejido adiposo subcutáneo representa la respuesta fisiológica normal a situaciones con un exceso en la ingesta y un gasto energético limitado, actuando como “sumidero de energía”. Cuando este tejido presenta un déficit en la capacidad de almacenaje, se incrementa el flujo de ácidos grasos circulantes, aumentando así la grasa alrededor de diversos órganos, depósitos ectópicos (Freedland, 2004). Por el contrario, el tejido adiposo visceral se asocia a un estado de

hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, disminución en los niveles de HDL, disminución de la tolerancia a la glucosa, aumento de lipoproteínas ricas en apolipoproteína B (VLDL y LDL) y esteatosis hepática. Todos estos estados asociados son característicos del síndrome de resistencia a la insulina, por lo que el riesgo de desarrollar diabetes es mayor en individuos con un exceso en el tejido adiposo visceral (Ibrahim, 2010).

2.2.1. Componentes del tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo blanco está formado por varios tipos celulares, principalmente por adipocitos maduros, pero además contiene otros tipos que constituyen la fracción vascular en la que se encuentran fibroblastos, macrófagos y células endoteliales (Figura 6).

Los **adipocitos** constituyen las células más abundantes del tejido adiposo, encargados de almacenar fundamentalmente triglicéridos. Están adaptados para acumular y liberar ácidos grasos modificando su tamaño en función de las condiciones del individuo. Además de tener una función energética están asociados a procesos inflamatorios (Sheehan and Jensen, 2000) por lo que son un vínculo para el desarrollo de la obesidad, el síndrome metabólico u otras enfermedades asociadas.

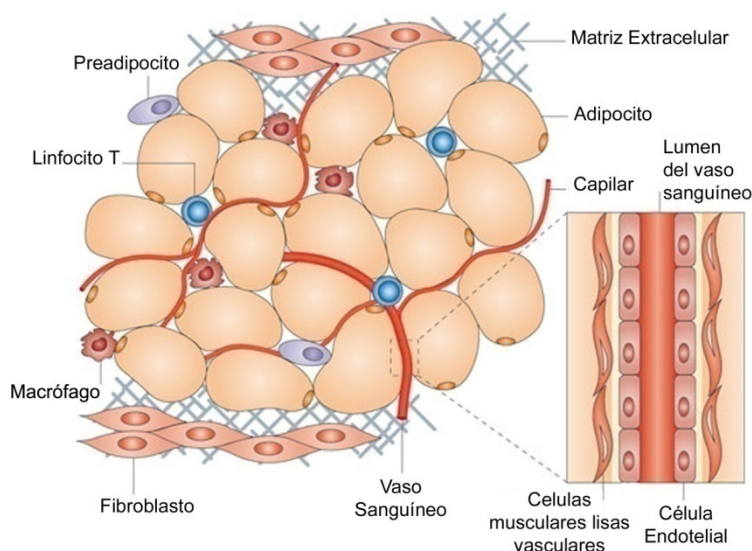


Figura 6. Componentes del tejido adiposo blanco. Figura adaptada de Ouchi y col.(Ouchi et al., 2011).

La **fracción vascular** incluye las células vasculares, los fibroblastos y las células precursoras de adipocitos (Gimble et al., 2007). El tejido adiposo está ampliamente irrigado por una red capilar constituida por pericitos, células endoteliales y las células musculares lisas. La vasculatura del tejido adiposo juega un papel

importante en el desarrollo del tejido adiposo así como en su funcionalidad debido a la secreción de factores proangiogénicos por parte de los adipocitos y de las células de la fracción vascular (Cao, 2013).

Otros tipos celulares que forman la fracción vascular son las células sanguíneas y del sistema inmune (monocitos, macrófagos, eritrocitos, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos), que ejercen un gran control en el metabolismo del organismo. El crecimiento del tejido adiposo en condiciones de obesidad provoca un incremento del sistema inmune, liberándose un gran número de citoquinas que inducen una resistencia a la insulina en el tejido adiposo (Schipper et al., 2012).

Finalmente, en la fracción vascular encontramos las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC del inglés *Adipose Stem Cells*) y los preadipocitos. Este componente celular es el encargado de mantener la renovación de la población de adipocitos. Las ASCs son la población de células madre mesenquimales adultas que tras un proceso de diferenciación se convierten en preadipocitos, comprometiéndose así hacia el linaje adipocítico (Cawthorn et al., 2012b). Ambas poblaciones presentan una morfología muy similar y las diferencias entre ellas no están bien establecidas. Una de las diferencias es la capacidad de diferenciación a distintos tipos celulares, ya que las ASC pueden diferenciarse a otros linajes de la línea mesenquimal, mientras que los preadipocitos han perdido esta capacidad de multipotencia y solo pueden dar lugar a adipocitos maduros (Cawthorn et al., 2012a).

2.2.2. Metabolismo del tejido adiposo blanco.

Como tradicionalmente se ha descrito, el tejido adiposo es el principal almacén de energía en forma de triglicéridos o grasa. Los adipocitos contienen la maquinaria necesaria para el metabolismo de los lípidos; llevan a cabo la lipogénesis, proceso por el cual sintetizan los triglicéridos, y la lipólisis, proceso mediante el que los triglicéridos son convertidos en glicerol y ácidos grasos libres que pasan al torrente sanguíneo para proporcionar al resto de los tejidos la energía necesaria.

La **lipogénesis** es el proceso por el cual se sintetizan triglicéridos en el tejido adiposo pero también tiene lugar en el hígado, los cuales serán transportados al tejido adiposo para su almacenaje (figura 7). En los adipocitos la formación de triglicéridos comienza con la captación de glucosa a través del transportador de glucosa 4 (Glut4), el cual adquiere un cambio conformacional en la membrana plasmática gracias a la acción de la insulina. Cuando el aporte energético es alto, la actividad del ciclo de Krebs es máxima favoreciéndose la síntesis de ácidos grasos y su almacenamiento en la gota lipídica del adipocito. Pero además se acumularán los ácidos grasos

provenientes del hígado mediante la captación de estos por el adipocito a través de la lipoproteína lipasa.

La **lipolisis** es la vía catabólica que permite la hidrólisis de triglicéridos almacenados en el adipocito en NEFA (del inglés *Non-esterified fatty acids*) y glicerol (figura 7). Este proceso está regulado por las catecolaminas y los péptidos natriuréticos que activan las lipasas para la hidrólisis de los triglicéridos acumulados. Pero también lo está por la insulina que inhibe el proceso anterior y aumenta la actividad lipogénica, y el glucagón.

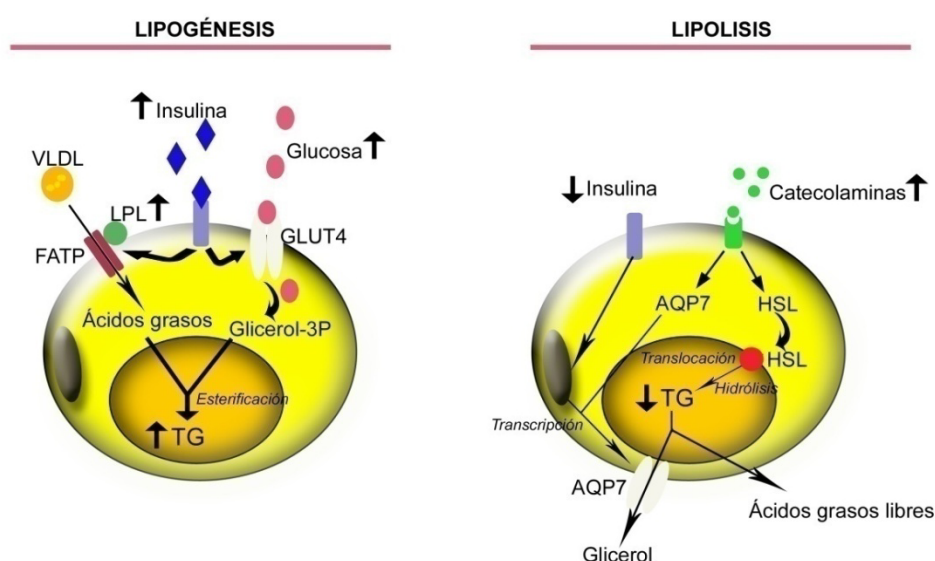


Figura 7. Lipogénesis y lipólisis en los adipocitos. El esquema muestra el proceso de lipogénesis tras un aumento de insulina en sangre. Durante la lipogénesis la enzima *lipoprotein lipase* (LPL) degrada los triglicéridos (TG) de las lipoproteínas (VLDL, del inglés *Very low density lipoprotein*) y de los quilomicrones. Por otro lado la insulina estimula la captación de glucosa y su metabolismo a glicerol-3P. Los ácidos grasos que entran en el adipocito son esterificados junto al glicerol-3P para sintetizar y almacenar los TG en la vacuola lipídica. Cuando los niveles de glucosa e insulina son bajos, se produce la secreción de hormonas catabólicas que activan el proceso de lipólisis. Las catecolaminas activan la síntesis y movilización de la lipasa sensible a hormonas (HSL, del inglés *Hormone sensitive lipase*), cuya translocación permite la hidrólisis de los TG. Los ácidos grasos y el glicerol derivados son secretados a la circulación para ser usados por los tejidos ante una demanda energética (Jaworski et al., 2007, Wang et al., 2008). AQP7, *aquaporin-7*; FATP, *Fatty acid transport protein*; Glycerol-3P, *Glycerol-3-phosphate*; Glut4, *Glucose transporter type 4*. Figura adaptada de Maeda y col (Maeda et al., 2008).

Ambos procesos están fuertemente regulados por factores hormonales (Jaworski et al., 2007), por lo que la alteración de estas vías y, por consiguiente, el aumento de los ácidos grasos circulantes asociado, conlleva un incremento de peso y desencadena una resistencia a la insulina.

2.2.3. Tejido adiposo blanco como órgano endocrino.

Actualmente está reconocido el tejido adiposo, no solo como un órgano de almacenamiento de energía, sino como un órgano endocrino debido a su implicación en la homeostasis y regulación del metabolismo (Ahima et al., 2000). En 1994, se identificó al tejido adiposo como la fuente de leptina, hormona cuya función endocrina se ha visto implicada en la regulación de la reproducción (Cunningham et al., 1999) y la función inmune (Rajala and Scherer, 2003). En la última década numerosas moléculas derivadas del tejido adiposo, incluyendo citoquinas, quimiocinas y otros factores, tienen un impacto en la homeostasis y el metabolismo del tejido adiposo (Tabla 2.).

Adipoquinas	Función	Célula secretora
Adiponectina	Metabolismo lipídico	Adipocitos
Adipsina	Estrés y respuesta inmune	Adipocitos , macrófagos M2
Angiotensinógeno	Homeostasis vascular	Adipocitos, SVF
Factor de necrosis tumoral- α	Inflamación, arteriosclerosis, IR	Adipocitos, macrófagos M1
Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Inflamación	Adipocitos, ASC, células SI
Factor-beta de crecimiento transformador	Adhesión y migración celular, crecimiento y diferenciación	Adipocitos, SVF, ASC
Hormonas esteroideas	Metabolismo lipídico, IR	Adipocitos, preadipocitos
Inhibidor-1 del activador del plasminógeno	Homeostasis vascular	Adipocitos, SVF
Interleuquina-1	Inflamación, IR	Macrófagos M1
Interleuquina-6	Inflamación, arteriosclerosis, IR	Adipocitos, SVF
Interleuquina-8	Proaterogénesis	Adipocitos, SVF
Interleuquina-10	Inflamación, IR	Adipocitos, macrófagos M2
Leptina	Ingesta de alimentos, reproducción, angiogénesis y sistema inmune	Adipocitos
Lipoproteína lipasa	Metabolismo lipídico	Adipocitos
Omentina	IR	SVF, macrófagos
Perilipina	Metabolismo lipídico	Adipocitos
Prostaglandinas	Flujo sanguíneo, lipólisis, diferenciación celular	Adipocitos, ASC
Proteína C reactiva	Inflamación, arteriosclerosis, IR	SVF
Proteína de unión a ácidos grasos	Metabolismo lipídico	Adipocitos, macrófagos
Proteína quimioatrayente de monocitos-1	Proaterogénesis, IR	Adipocitos, macrófagos M1
Resistina	Inflamación, IR	Adipocitos, macrófagos M2
Trombospondina	Angiogénesis	Adipocitos
Visfatina	IR	Adipocitos, preadipocitos, neutrófilos.
Glicoproteína zinc-alfa 2	Metabolismo lipídico, cáncer y caquexia	Adipocitos, SVF

Tabla 2. Factores secretados por el tejido adiposo blanco. Adaptación de Trayhurn y col. (Trayhurn and Wood, 2005), y Balistreri y col. (Balistreri et al., 2010). ASC, del inglés *Adipose-derived stem cells*; IR, del inglés *Insulin resistance*; SVF, del inglés *Stromal vascular fraction*.

La secreción de citoquinas (denominadas adipoquinas en el tejido adiposo) pueden actuar a nivel local (función autocrina y paracrina) o a nivel sistémico (función endocrina) (Figura 8). Estos factores liberados por el tejido adiposo no solo son secretados por el adipocito, sino que también por las células que componen la fracción vascular.

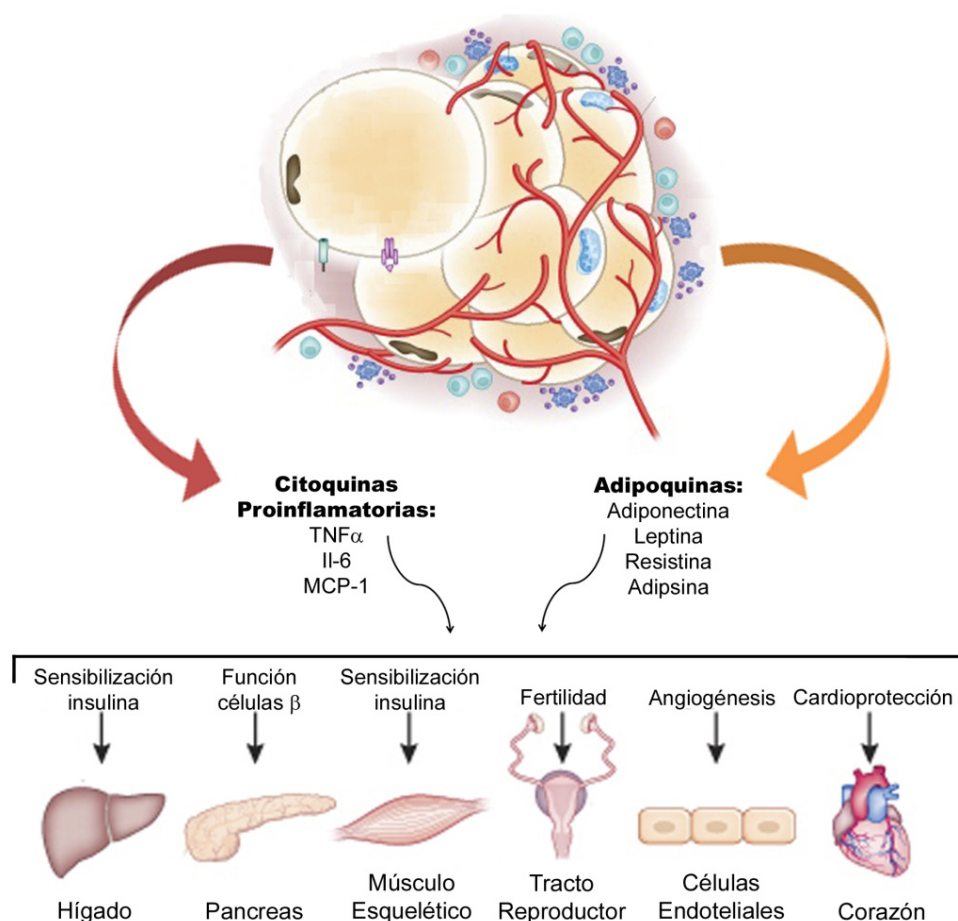


Figura 8. Función endocrina del tejido adiposo en la homeostasis. El tejido adiposo libera factores de secreción denominados adipoquinas, así como citoquinas pro-inflamatorias que garantizan respuestas metabólicas adecuadas en tejidos diana clave, como el hígado, el músculo, etc. Abreviaturas: TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; MCP-1: proteína quimio-atrayente de monocitos 1. Figura adaptada de Philipp E. Scherer, Katie Vicari and Marina Corral.

2.2.4. Fisiología del tejido adiposo blanco en el desarrollo de la obesidad.

El tejido adiposo blanco es un órgano metabólicamente activo que desempeña un papel central en la homeostasis energética. De hecho, es capaz de modificar sus propias características funcionales y morfológicas de acuerdo con las condiciones fisiológicas o patológicas predominantes (Ouchi et al., 2011).

En condiciones no obesas, la función metabólica es normal, y los adipocitos secretan adipoquinas antiinflamatorias (adiponectina). Con el incremento del tejido

adiposo se produce una disfunción metabólica media, aumentando la inflamación y disminuyendo el control metabólico. La respuesta inflamatoria se traduce en un aumento local de la producción de citoquinas, $\text{TNF}\alpha$, IL6 y leptina entre otras. En condiciones de obesidad la disfunción metabólica es completa. La producción de citoquinas pro-inflamatorias está elevada, desapareciendo el control metabólico y disminuyendo la función vascular (Figura 9).

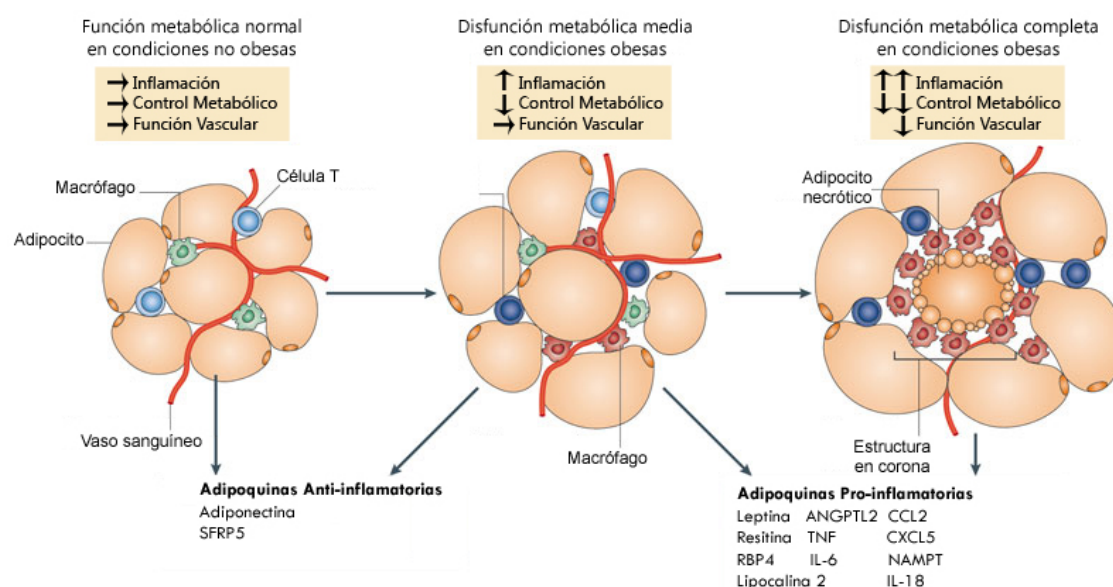


Figura 9. Modulación del tejido adiposo. Clasificación del tejido adiposo en función de las características estructurales y funcionales. Figura adaptada de Ouchi y col (Ouchi et al., 2011). *ANGPTL2*, *Angiopoietin-related protein 2*; IL, *Interleukin*; *CCL2*, *Monocyte chemoattractant protein-1*; *CXCL5*, *C-X-C motif chemokine 5*; *NAMPT*, *Nicotinamide phosphoribosyltransferase*; *RBP4*, *Retinolbinding protein 4*; *SFRP5*, *Secreted frizzled-related protein 5*.

Así mismo la sobreproducción del $\text{TNF}\alpha$ activa la lipólisis e inhibe los niveles de LPL y GLUT-4 como mecanismo de respuesta que trata de reducir el tamaño excesivo de los depósitos grasos. Sin embargo, niveles altos de $\text{TNF}\alpha$ en el tejido adiposo pueden deberse a alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad como es la resistencia a la insulina (Nieto-Vazquez et al., 2008).

En situación de obesidad, los adipocitos presentan un aumento en la expresión génica de angiotensinógeno y plasminógeno (PAI-1), provocando un efecto deletéreo sobre la función vascular. Niveles altos de plasminógeno suponen un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria (Lyon et al., 2003), y niveles alterados de angiotensina producen un efecto estimulante sobre la diferenciación del tejido adiposo, debido a su acción lipogénica (Jones et al., 1997).

El “ambiente inflamatorio” debido a la obesidad produce un incremento de $\text{TNF}\alpha$, IL-6, PAI-1, leptina, fibrinógeno y los componentes del sistema renina-angiotensina-

aldosterona. Esto induce y favorece la infiltración de los macrófagos. Así, los cambios en el tejido adiposo generan una secreción adipocitaria de citoquinas, induciéndose la liberación de quimioatrayentes y perpetuando la inflamación local del tejido adiposo (Weisberg et al., 2003, Wellen and Hotamisligil, 2003).

2.3. Tejido Adiposo Marrón.

Los adipocitos marrones presentan múltiples gotas lipídicas (multilocular) y numerosas mitocondrias para llevar a cabo una de las principales funciones del tejido adiposo marrón, la termogénesis. Este tejido multilocular es especialmente abundante en los recién nacidos, permitiendo el mantenimiento del calor corporal, pero además, estudios recientes demuestran que los adultos conservan algunos depósitos metabólicamente activos de TAM. Estos depósitos podrían estar implicados en la liberación de triglicéridos y en el uso de glucosa, así como actuar como fuente de adipoquinas (Gomez-Hernandez et al., 2013).

El tejido adiposo marrón está constituido por varios componentes celulares, siendo el más abundante los adipocitos marrones. Al igual que el tejido adiposo blanco, está fuertemente innervado y vascularizado y presenta una población de células progenitoras con propiedades de célula madre adulta (figura 10), capaces de autorenovarse y diferenciarse (Silva et al., 2014).

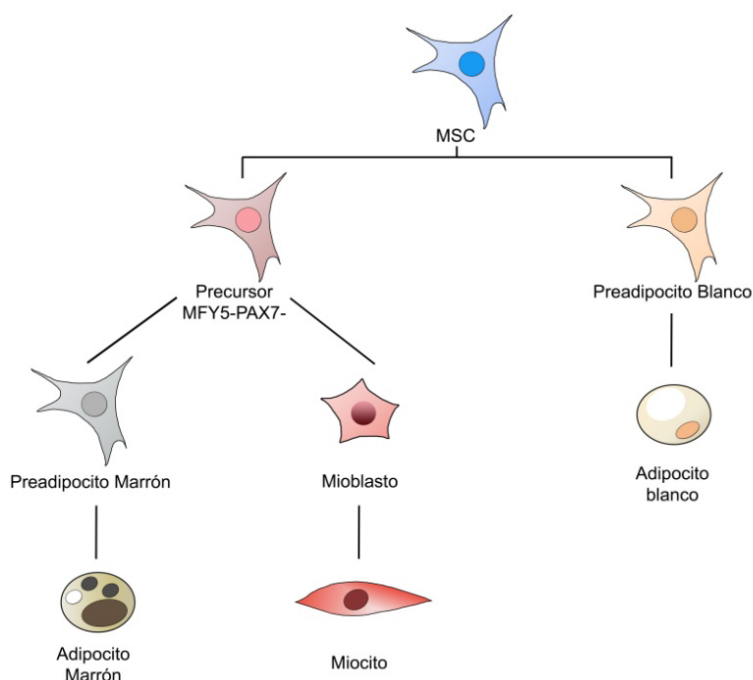


Figura 10. Relación entre los adipocitos blancos, los marrones y los miocitos. Los adipocitos marrones comparten el mismo precursor celular que los miocitos esqueléticos. Figura adaptada de Cristancho y col(Cristancho and Lazar, 2011).

A pesar de las diferencias entre los adipocitos del tejido adiposo blanco y el marrón, ambos tipos celulares se diferencian a partir de MSC (Gesta et al., 2007). Estudios recientes revelan que los adipocitos del TAM están más relacionados con los miocitos del músculo esquelético derivados también de las MSC (Figura 10), divergencia que se da durante el desarrollo temprano de los tejidos adiposos. Sin embargo, se conoce que los adipocitos blancos podrían adquirir características de los adipocitos marrones ante estímulos de transdiferenciación determinados (Harms and Seale, 2013).

3. CÉLULAS MADRE ADULTAS

La investigación en células madre comenzó cuando en 1916 Danchakoff describe la existencia de una célula como precursora de otras en la médula ósea (Danchakoff, 1916, Till and Mc, 1961). Posteriormente, se descubrió que la médula contiene por lo menos dos clases de células madre; una población de células madre hematopoyéticas (HSC del inglés "*Hematopoietic stem cell*") responsable de la formación de las células sanguíneas y una población de células madre mesenquimales (MSC del inglés "*Mesenchymal stem cell*") responsable de la generación de células de hueso cartílago, grasa y tejido conectivo fibroso.

3.1. Propiedades de las células madre adultas.

La célula madre se define como un tipo de célula indiferenciada que posee dos características importantes que las distinguen de otros tipos de células. La primera, es que son células capaces de auto-renovarse (del inglés "*stemness*"), generando así células con idénticas características y sin pérdida de funcionalidad. La segunda es que son capaces de diferenciarse bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, generando así células comprometidas a diferentes linajes celulares como células musculares cardíacas o células de páncreas que produzcan insulina (Pittenger et al., 1999).

Las células madre mesenquimales no solo se encuentran en la médula ósea, sino que también se han identificado en el estroma de multitud de órganos y tejidos. La función principal es residir en un área específica del tejido donde permanecen sin dividirse hasta que son activadas por una enfermedad o lesión del tejido.

3.2. Células madre del tejido adiposo (ASC).

En el tejido adiposo se encuentra una población de células madre mesenquimales denominadas células madre derivadas del tejido adiposo (ASC del inglés “*Adipose-derived stem cells*”) (Gimble et al., 2007). Como células madre mesenquimales, presentan las características propuestas por el *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al., 2006):

I. Las MSC deben adherirse al material plástico mientras se mantengan en condiciones de cultivo estándar.

II. Las MSC deben presentar la habilidad de diferenciarse a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico.

III. Las MSC deben expresar los siguientes marcadores de superficie: CD105, CD73 Y CD90 y no expresar: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19, ni moléculas de superficie HLA II (del inglés “*Human leukocyte antigen*”).

Además, como células mesenquimales, las ASC son células no inmunogénicas debido a que no expresan moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo II (CMHII) ni moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, aunque sí expresan moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo I (CMHI) (Chamberlain et al., 2007).

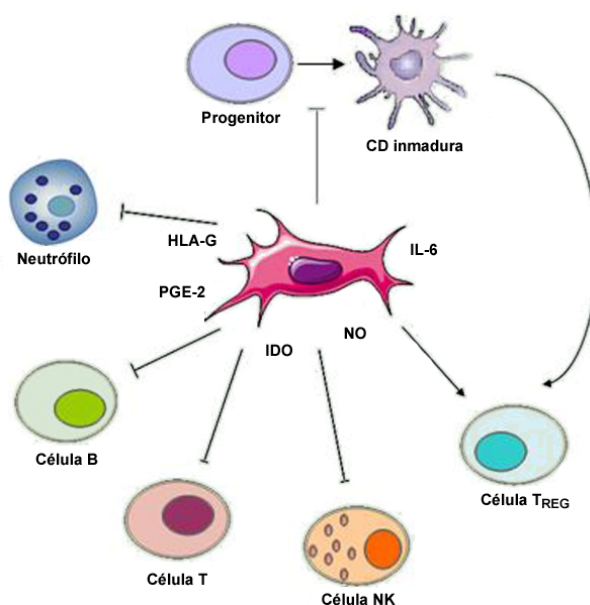


Figura 11. Interacciones entre las MSC y el sistema inmune. Tras la activación de las MSC, estas secretan mediadores solubles como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE-2), indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), IL-6 y antígeno leucocitario humano (HLA-G). La producción de estos mediadores regula la proliferación y la función de diversas células del sistema inmune, así como induce a las células T reguladoras (T_{REG}), directa o indirectamente a través de la generación de células dendríticas (DC) inmaduras. Figura tomada de Ghannam y col (Ghannam et al., 2010).

Estas características permiten definir a las células madre mesenquimales como moduladoras naturales de la respuesta inmune (figura 11), desempeñando papeles importantes en procesos donde está implicado el sistema inmune, como es la tolerancia en trasplantes, la autoinmunidad, la evasión de tumores o la tolerancia feto-materna (Fibbe et al., 2007).

3.2.1. Características de las ASC.

Se ha desarrollado un gran interés en el estudio de las ASC debido al gran número de células que se pueden obtener del tejido adiposo a través de un procedimiento poco invasivo. Las ASC no presentan un marcador específico de superficie para su identificación sino que presentan un perfil homogéneo y reproducible de antígenos. Habitualmente se definen por los marcadores propios de las MSC, pero recientemente la “*International Federation for Adipose Therapeutics and Science*” (IFATS) sugiere marcadores adicionales para las ASC, por lo que se reconoce la existencia de diferentes marcadores de superficie en función del origen (Tabla 3).

Marcadores de superficie			
CD166	ALCAM	Sca-1	Lys-6A2
CD31	PECAM-1	CD9	P24
CD34	Stem cell marker	CD10	Neprilysin
CD117	cKit	CD13	Aminopeptidase N
CD15	LewisX	CD44	H-CAM
CD73	NT5E	CD54	ICAM-1
CD146	MCAM (melanoma cell adhesión molecule)	CD55	DAF
SMA	Smoth muscle actin	CD71	TFRC (transferrin receptor)
ABCG2	ABCG2	CD90	Thy-1
CD105	Endoglin	CD120a	TNFR-1
CD140a	PDGFR- α	CD124	IL-4R
CD49d	$\alpha 4$ -integrin	CD271	L-NGFR
Stro-1	Stromal cell antigen 1	HLA-I	Human leukocyte antigen class I
CD29	$\beta 1$ -integrin	Vim	Vimentin
CD140 β	PDGFR- β		

Tabla 3. Marcadores de superficie característicos de las ASC (Cawthorn et al., 2012a).

Las ASC presentan una forma fibroblástica, son capaces de adherirse, crecer en el cultivo celular y pueden diferenciarse a otras líneas celulares. Debido a su origen mesenquimal, al igual que todas las células mesenquimales presenta capacidad inmunomoduladora por la que pueden evitar el rechazo alógeno. Las MSC son capaces de impedir el reconocimiento de antígenos al interferir en la función de las

células dendríticas y a su capacidad de secretar citoquinas. (Ghannam et al., 2010). Además las ASC juegan un papel muy importante en la revascularización de los tejidos dañados, la inhibición de la apoptosis y en la inmunomodulación debido a que son células metabólicamente activas.

El origen de nuevos adipocitos es un fenómeno constante, donde aproximadamente un 10% de ellos son renovados cada año en humanos (Spalding et al., 2008). Existen varios estudios que intentan identificar la localización de las ASC dentro del tejido adiposo. Mediante análisis histológicos se establece que la población de ASC reside en la zona perivascular del tejido (Tang et al., 2008), por lo que los adipocitos y la vasculatura se desarrollan al mismo tiempo. Por otro lado, se plantea la posibilidad de que estos precursores provienen de fuera del tejido adiposo (Crossno et al., 2006), debido a la similitud que presentan con las MSC de médula ósea. De hecho se sugiere que es la médula ósea el órgano central productor de MSC que abastece a las poblaciones del resto de órganos (Mansilla et al., 2011).

3.2.3. Aplicaciones terapéuticas.

Debido a su capacidad multipotencial y a su plasticidad, las células mesenquimales constituyen un blanco perfecto para su aplicación en clínica. Se ha demostrado en modelos experimentales que las MSC son capaces de regenerar tejidos deteriorados o lesionados como hueso, cartílago, tejido hepático o miocárdico (Penn et al., 2011, Galle et al., 2010, Di Bonzo et al., 2008).

Las células madre usadas en terapia celular suelen presentar las siguientes características:

- Se encuentran de forma abundante en el nicho de origen.
- Se obtienen mediante procedimientos mínimamente invasivos.
- Se pueden diferenciar a diversos linajes celulares de forma controlada.
- Se pueden trasplantar de forma segura y eficaz.
- Se pueden preparar según los estándares de control y calidad de las guías de buenas prácticas de preparación.

El tejido adiposo constituye uno de los tejidos donantes de células madre más atractivos debido a su fácil obtención y a la alta cantidad de células aisladas. Además es un proceso sencillo y fácilmente reproducible (Gimble et al., 2012, Mizuno et al., 2012). Con el aumento de la incidencia de la obesidad, el tejido adiposo subcutáneo es abundante y de fácil acceso; 1g de tejido adiposo contiene aproximadamente 5×10^3 células madre, lo que supone 500 veces más que el obtenido a partir de 1g de tejido

óseo. Gimble y col, han demostrado que el uso de ASC en tejidos lesionados, pueden secretar citoquinas y factores que estimulan la recuperación de manera paracrina. Las ASCs modulan el nicho de las células mediante la estimulación y la captación de las células madre endógenas al sitio, promoviendo su diferenciación.

La terapia celular, tiene por objeto el uso de las células madre para reparar las células o los tejidos dañados. Uno de los objetivos de estas terapias es la capacidad de diferenciación de las células madre en el tipo de célula específica requerida para reparar las células o los tejidos dañados. Las propiedades de multipotencia de las ASC son de particular interés en la terapia celular.

La mayoría de los ensayos clínicos realizados con las ASCs, se encuentran en fase II-III, por lo que se podrá comprobar la eficacia de los tratamientos, así como definir nuevas áreas de aplicación.

3.2.3. Consecuencias de las patologías sobre las poblaciones ASC.

La población de células madre del tejido adiposo se encuentran en un nicho específico en el cual, no solo se encuentran componentes celulares, sino que existe una integración de señales que conforman un microambiente especializado y que pueden regular la biología y función de las células (Scadden, 2006). El microambiente en el que se encuentran las ASC es esencial para el mantenimiento de su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad (Kolf et al., 2007).

Estudios recientes sugieren que la alteración en la homeostasis de las células madre provoca una disminución prematura e irreversible de su potencial regenerativo. Se ha demostrado como la presencia de hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión o los factores ambientales afectan de forma negativa a las células progenitoras endoteliales circulantes (EPC del inglés "*Endothelial progenitor cells*"), disminuyendo el número y la supervivencia (Hamed et al., 2011). Además, estas células presentan una disminución en su capacidad angiogénica así como de migración (Fadini et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito también que las BM MSC (del inglés *Bone marrow mesenchymal stem cell*) de individuos con diabetes, presentan mayor grado de senescencia y apoptosis y por lo tanto tienen disminuida su viabilidad (Stolzing et al., 2012).

La edad es otro ejemplo del deterioro de órganos y tejidos que provocan una deficiencia en las células madre del organismo. Se ha descrito que el envejecimiento reduce el número de EPC circulantes y que estos presentan un fenotipo preapoptótico, mayor senescencia y menor funcionalidad (Hoetzer et al., 2007). Del mismo modo, se ha visto que las ASC también se ven afectadas por la edad del individuo,

disminuyendo la capacidad de proliferación, el potencial angiogénico y de diferenciación (Zhu et al., 2009, Efimenko et al., 2011).

Asimismo, la obesidad también se ha descrito como una enfermedad que afecta a la población de células madre. Se ha visto que, al igual que la diabetes y el envejecimiento, la obesidad afecta a la población de EPC cuya capacidad clonogénica está disminuida en individuos obesos respecto a individuos delgados (MacEneaney et al., 2009). Además la obesidad reduce la respuesta osteogénica de las BM-MSC (Friedl et al., 2009) y afecta a la población de ASC disminuyendo su capacidad de regeneración en comparación con las poblaciones de individuos delgados (Roldan et al., 2011). Se ha visto que la capacidad de diferenciación adipogénica de las ASC de tejido subcutáneo mamario está disminuida en mujeres con IMC elevado (Van Harmelen et al., 2004). Por otro lado se ha visto que las ASC de individuos obesos presentan una mayor expresión de genes pro-inflamatorios (Nair et al., 2005).

Debido a la gran alternativa para la terapia celular que representan las ASC, es necesario el conocimiento y la comprensión de los posibles mecanismos afectados en las poblaciones celulares debido a la obesidad. Existen varios puntos que se deberían tener en cuenta a la hora de utilizar células madre del tejido adiposo en terapias celulares como la funcionalidad de las células, la localización anatómica, el género y la edad del donante. A pesar de estas limitaciones, las ASC se han convertido en la fuente principal de células madre por sus ventajas en la clínica, debido a la posibilidad de usar esta población de forma tanto autóloga como alógena.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El uso de las células madre como terapia celular es considerado como uno de los tratamientos más novedosos. En los últimos años se han utilizado diversos tipos de células madre, siendo las ASC las que han adquirido un mayor interés debido a su fácil aislamiento y a su potencial terapéutico. A pesar de las ventajas que presenta esta población de células madre, se desconocen los mecanismos por los cuales llevan a cabo el proceso regenerativo.

El tejido adiposo es un órgano multifuncional encargado de la función energética y endocrina, pero también es un gran reservorio de células madre mesenquimales. Actualmente se ha descrito que las ASC están implicadas en el remodelado del tejido adiposo, además de jugar un papel importante en la revascularización de tejidos dañados.

Con el desarrollo de la obesidad, el tejido adiposo se acumula de forma excesiva, dando lugar a una disfunción metabólica crónica así como un incremento de la probabilidad del desarrollo de otras patologías como la diabetes, el cáncer o las enfermedades cardiovasculares entre otras. Por ello en la obesidad hay un constante estrés metabólico en el tejido adiposo que promueve la hipertrofia del tejido adiposo y que conlleva una alteración de la homeostasis de las células.

Dado que el tejido adiposo durante la obesidad se encuentra en un constante desequilibrio, y que este es un gran reservorio para la obtención de células madre, es importante conocer el potencial regenerativo y los cambios que presenta esta población para su uso en terapias celulares.

Teniendo en cuenta estas premisas, la hipótesis de este trabajo se fundamenta en el estudio de la alteración en el potencial regenerador de las ASC por la acumulación de diversos factores de riesgo durante la obesidad.

Con el propósito de resolver esta hipótesis, se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Aislamiento y estudio del fenotipo de las células madre residentes en el tejido adiposo en condiciones de obesidad.
2. Análisis de las principales propiedades de las ASC: efecto de la obesidad en la capacidad de diferenciación, regeneración y proliferación.
3. Estudiar si la disfunción metabólica asociada a la obesidad afecta a la población de las ASC.
4. Estudio del efecto de la obesidad en la estabilidad genética de las ASC.
5. Establecer el posible mecanismo por el cual la obesidad podría afectar a la población residente de ASCs.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Líneas celulares.

Los modelos animales utilizados fueron ratones C57BL/6 de cuatro meses de edad, mantenidos con dieta normal para la condición control o con una dieta alta en grasas (58Y1) para la condición obesa. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical siguiendo los procedimientos del Instituto Nacional de Salud y Cuidado Animal.

Las muestras humanas se obtuvieron a partir de pacientes sometidos a cirugía bariátrica tras el informe de consentimiento y siguiendo los principios de “*WMA Declaration of Helsinki and the NIH Belmont Report*”. Las muestras fueron recogidas de pacientes con índice de grasa inferior a 22 Kg² para la condición control y de pacientes con índice de grasa superior a 30 Kg² para la obesa.

1.2. Obtención de las células: técnica del explante.

Las líneas de células madre mesenquimales se obtuvieron de tejido adiposo subcutáneo (ASCs) mediante la técnica del explante (Galvez et al., 2009, Bernal et al., 2012a). Se utilizaron placas multipocillos de 24 pocillos a las que se aplicó *Matrigel* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EEUU) únicamente en los contornos del pocillo, y se dejó gelificar en el incubador a 37°C. Las muestras de grasa obtenidas se disgregaron en pequeños fragmentos y se seleccionaron bajo un microscopio aquellos con mayor número de vasos sanguíneos con el objetivo de facilitar la salida de las células. En el centro de cada pocillo se colocaron dos-tres secciones del tejido disgregado y se añadió medio de cultivo estándar; *Dubecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US), suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, *Fetal bovine serum*, Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina (Lonza, Basilea, Suiza) y 105U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza), considerado como medio completo. Los explantes se mantuvieron en condiciones de cultivo en el incubador a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 21% de O₂ y 95% de humedad.

A los 7 días una población de células comienza a salir del explante sobre una monocapa de fibroblastos. Estas células refringentes fueron recogidas y clonadas por dilución límite, formándose colonias CFU-F. Los clones fueron llamados cASCs para las células de individuos control u oASCs para las de obesos.

1.3. Condiciones de cultivo.

Las células fueron sembradas en placas convencionales de cultivo (BD Biosciences, San José, CA, US) usando medio de cultivo completo. Los cultivos celulares se mantuvieron en el incubador a 37°C, en una atmósfera con CO₂ al 5% y a presión parcial de oxígeno del 21% (presión atmosférica) y una humedad del 95%.

1.4. Caracterización celular.

Las ASCs fueron caracterizadas por los marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Para la caracterización de los marcadores de membrana de las poblaciones celulares, se utilizó un tubo de citometría que contenía únicamente células, para normalizar la auto-fluorescencia, y un tubo con la mezcla de anticuerpos para el marcaje. Se añadieron 10⁶ células por tubo de citometría que fueron bloqueadas por incubación en oscuridad y hielo durante 15 min. con PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 0,1% junto al Anti-Fc (1:400). Tras un lavado con PBS y centrifugación, el precipitado de células fue incubado con PBS-BSA para el control negativo, o con PBS-BSA junto al anticuerpo en dilución 1:100 para el marcaje (tabla 1). Los tubos fueron mantenidos en hielo y oscuridad durante 15 min. Por último, tras lavar con PBS, centrifugar y descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS-BSA, manteniéndose en hielo y oscuridad hasta su análisis en el citómetro.

Antígeno	Marcador	Fluorocromo	Casa comercial
CD45 (LCA)	Hematopoyético	V450	BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, EEUU
CD44	Mesenquimal	Alexa-488	Biogen, Pacific Heights San Diego, EEUU
CD34	Mesenquimal	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, EEUU
Sca 1(Ly-6A/E)	Células madre	PECy7	BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, EEUU

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la detección de los antígenos por citometría de flujo.

2. ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN

2.1. Diferenciación in vitro.

Para el ensayo de diferenciación, se siembran 4x10⁴ células de las distintas líneas celulares de ASCs en placas multipocillo de 24 pocillos (BD Biosciences, San José, CA, US) con DMEM completo. Tras 24h de cultivo, el medio se reemplazó por el correspondiente medio de diferenciación.

2.1.1. Diferenciación adipogénica.

Una vez sembradas las células y transcurridas 24h, se añade el medio de inducción adipogénica compuesto por DMEM completo suplementado con 10µg/ml transferrina, 15mM NaHCO₃, 15mM HEPES, 33µM biotina, 17µM pantotenato, 1nM insulina, 20pM triiodotironina, 1µM cortisol, y 105U/ml de penicilina/estreptomicina. El medio de diferenciación se renovó cada tres o cuatro días, durante tres semanas. La acumulación de triglicéridos se visualizó tras la fijación de las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min. a temperatura ambiente. Una vez fijadas se lavaron 2 veces con agua destilada y con isopropanol al 60% en agua destilada. Después del secado, las células se tiñeron con una solución de Aceite rojo O en isopropanol al 60% en agua destilada durante 20 min. a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y precipitados. Los cúmulos intracelulares teñidos de rojo fueron captados por un microscopio óptico de campo claro IX51 Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, EEUU). La acumulación de triglicéridos se cuantificó espectrofotométricamente a 510nm.

2.1.2. Diferenciación osteogénica.

Transcurridas 24h en condiciones estándar de cultivo, se añadió el medio de inducción osteogénica compuesto por IMDM suplementado con 9% FBS, 9% HS, 2mM L-glutamina, 100U/ml penicilina, 100ug/ml estreptomicina, 50ng/ml L-tiroxina, 20mM β-glicerol fosfato, 100nM dexametasona y 50µM ácido ascórbico. El medio de diferenciación se renovó cada tres o cuatro días, durante un periodo de dos semanas, tras el cual las células se fijaron en formalina al 10% y se tiñeron con rojo alizarín al 10%. Los cúmulos de calcio se tiñeron de color rojo-marrón y fueron captados por un microscopio óptico de campo claro IX51 Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, EEUU).

2.1.3. Diferenciación condrogénica

Las células sembradas y mantenidas 24h en condiciones estándar de cultivo se incubaron con medio completo condrogénico compuesto por IMDM y suplementado con 100nM dexametasona, 50µg/ml de ácido ascórbico, 40µg/ml L-prolina, suplemento ITS, 1mM piruvato sódico, 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 10ng/ml TGFβ-3 y 100ng/ml BMP-2. El medio se renovó cada 3 días durante tres semanas. Los condrocitos se tiñeron con azul de toluidina con borato de sodio y fueron cuantificados por un microscopio de campo claro IX51 Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, EEUU).

3. ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD

3.1. Ensayo de migración por *transwell*.

Para evaluar la capacidad de migración de las líneas celulares, las células fueron sembradas en cámaras de migración *transwell* de 8mm de espesor (Corning Incorporated, Acton, MA). 600µl de medio completo fueron añadidos en la cámara inferior y 2×10^4 células en 80µl fueron sembradas en la cámara superior del *transwell*. Las células fueron incubadas durante 24h en condiciones estándar de cultivo para permitir la migración de las células a través de la membrana. Para incrementar la migración de las células se añadió 50ng/ml IL8, 50ng/ml SDF-1, 80ng/ml MCP-1, 30ng/ml TNF- α o 50ng/ml HMGB1 en la cámara inferior. Después de 24h de cultivo las células fueron fijadas con glutaraldehído al 4% en PBS durante 2h y teñidas con Azul de toluidina al 2% durante la noche. Las membranas se lavaron con agua destilada y las células de la cámara superior fueron eliminadas con un bastoncillo. La migración fue cuantificada mediante la captura con un microscopio de campo claro Nikon 90i (Nikon Instruments, Burgerweeshuispad, Amsterdam, The Netherlands).

3.2. Ensayo de migración por *Wound Healing*.

Para estudiar la migración en dos dimensiones de las líneas celulares, estas se sembraron en placas multipocillo de 24 pocillos. Tras 24h de cultivo las células en confluencia, se realizó una herida con la punta de pipeta estéril y se lavaron con PBS para eliminar todas las células que se hubieran levantado de la placa. Las células se incubaron durante 24h con medio completo o con 20ng/ml TNF- α . La migración de las células se monitorizó mediante un microscopio IX52 Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, EEUU) con el objetivo 4x a tiempo 0h y tras 24h de incubación. El porcentaje de cierre de la herida en las distintas condiciones se midió para calcular la migración.

3.3. Ensayo de invasión.

La capacidad de invadir de las distintas líneas celulares se evaluó mediante cámaras de migración *transwell* recubiertas con gelatina al 1% en PBS durante 1h a 37°C. Las células fueron tratadas como en el ensayo de migración por *transwell*.

3.4. Ensayo de angiogénesis.

Para medir la capacidad de formar vasos sanguíneos se utilizó una matriz de proteínas reconstituida como membrana basal (*Matrigel*). En una placa multipocillo de 96 pocillos se agregaron 60µl de *Matrigel* y se incubó durante 30 min. a 37°C para su

gelificación. Las células fueron sembradas sobre la matriz y se incubaron durante 24h en condiciones normales de cultivo. La formación de estructuras tubulares se evaluó por microscopio de campo claro IX51 Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, EEUU) con el objetivo 4x y se cuantificó el número de uniones en campos aleatorios.

4. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN Y LA APOPTOSIS DEL CULTIVO CELULAR

4.1. Curva de crecimiento celular.

Para medir la proliferación de las distintas líneas, las células se contabilizaron mediante la cámara de *Neubauer*. Las células se sembraron por triplicado en placas de multipocillo de 24 pocillos a una densidad de 5×10^3 células en medio completo DMEM. El número de células fue cuantificado cada día durante una semana. La monitorización del crecimiento celular se llevó a cabo mediante curvas de crecimiento, representando el número de células total por día.

4.2. Valoración de la apoptosis en el cultivo.

Para medir la apoptosis en el cultivo celular, se evaluó la asimetría de la membrana celular mediante análisis de citometría de flujo. Las células se procesaron según las instrucciones del kit “*Violet Ratiometric Membrane Asymmetry Probe/Dead Cell Apoptosis Kit*” (Invitrogen). Brevemente, las células fueron levantadas por tripsinización y lavadas dos veces con PBS. Posteriormente 10^6 células se resuspendieron en 1ml de PBS y se incubaron durante 5 min. a temperatura ambiente con el reactivo F2N12S 200nM y el SYTOX AAdvanced 1mM. Tras la incubación las células se analizaron en el citómetro de flujo LSRFortessa Analyzer (BD Biosciences, San Jose, Ca, USA) y los datos fueron analizados con el programa BD FACSDiva Software.

5. ESTUDIO METABÓLICO

5.1. Medida de la captación celular de glucosa.

Para medir la captación de glucosa, se cuantificó la incorporación de 2-desoxiglucosa marcada (3H-2DG) durante los últimos 10 min. del cultivo y en diferentes estados de la diferenciación adipogénica (día 0, 3, 5 y 7). Las células fueron cultivadas en placas multipocillo de 24 pocillos, diferenciadas a adipocitos y estimuladas o no con 10nmol/L de insulina durante 30min. Posteriormente se

incubaron con 3H-2DG durante 10 min. a 4°C. Las células se lavaron, se centrifugaron y se lisaron para medir las cuentas radioactivas por minuto (CPM) de cada muestra a través de un contador de centelleo. Los resultados se expresan como pmol de glucosa captada por mg de proteína.

5.2. Medida de lipolisis.

La lipolisis o ruptura de triglicéridos, fue estimada mediante la liberación de glicerol y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en el cultivo celular. Las células fueron cultivadas y mantenidas en medio sin suero durante toda la noche. Posteriormente fueron lavadas e incubadas a 37°C con 10nM Insulina durante 1h y a continuación con 1µM isoproterenol durante 15 min. La liberación de glicerol se midió enzimáticamente con el kit "*Free glicerol determination kit*" y la de NEFA mediante el kit "*Enzymatic colorimetric test*" (WakoChemicals, Neuss, Germany).

5.3. Cuantificación de la producción de citoquinas.

La producción de adipocinas fue cuantificada mediante el uso de de la tecnología "*Luminex xMAP technology*" (Millipore, Bedford, MA, USA) para múltiples inmunoensayos en los que simultáneamente se cuantificó la producción de adiponectina, MCP-1 y TNF-α en el medio de las células.

5.4. Análisis mitocondrial

5.4.1. Detección y cuantificación de mitocondrias.

La red de mitocondrias se analizó mediante inmunocitoquímica contra mitocondrias. Se sembraron 1×10^4 células sobre cristales con gelatina al 0,1% en PBS en placas multipocillo de 24 pocillos con DMEM completo. A las 24h de cultivo las células se fijaron con metanol frío durante 10 min., se lavaron con PBS y se incubaron con la sonda Mitotracker GreenTM a concentración 100nM durante 30 min. y a 37°C. Para marcar la membrana de las células se incubaron con el anticuerpo primario para la proteína caveolina-1 (CellSignaling Technology, Danvers, MA, US) en una dilución 1:500 durante toda la noche a 4°C. A continuación se eliminó el exceso de anticuerpo y las uniones inespecíficas con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario contra conejo conjugado con Alexa-488 (Invitrogen) a una dilución 1:500 en PBS durante 1h a TA. Las células se lavaron con PBS y se realizó una contra tinción nuclear de 30 min. a TA con DAPI 300nM. Posteriormente se utilizó Prolong como medio de montaje y se guardó a 4°C en oscuridad hasta la captura digital de las

imágenes con el microscopio Leica DM2500 – TSC SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Para evaluar el contenido en mitocondrias, las células se analizaron con el citómetro de flujo. Las células fueron levantadas por tripsinización y lavadas dos veces con PBS. Posteriormente 1×10^6 células se resuspendieron en 1ml de PBS conteniendo 100nM Mitotracker Green™ y se incubaron durante 30 min. en oscuridad a 37°C. Para la detección de células vivas, se incubaron con TOPRO-3 (LifeTechnologies). Tras las incubaciones se analizaron en el citómetro de flujo LSRFortessa Analyzer (BD Biosciences, San Jose, Ca, USA) y los datos fueron analizados con el programa BD FACSDiva Software.

5.4.2. Generación de ROS.

Para cuantificar la producción de especies de reactivas de oxígeno (ROS), las células se analizaron mediante citometría de flujo. Las células fueron levantadas por tripsinización y lavadas dos veces con PBS. Posteriormente 1×10^6 células se resuspendieron en 1ml de PBS conteniendo 1μM Mitosox Red™ y se incubaron durante 30 min. en oscuridad a 37°C. Para la detección de células vivas, se incubaron con TOPRO-3 (Lyfe Technologies). Tras las incubaciones se analizaron en el citómetro de flujo LSRFortessa Analyzer (BD Biosciences, San Jose, Ca, USA) y los datos fueron analizados con el programa BD FACSDiva Software.

5.4. Detección de la acidificación del medio y el consumo de oxígeno.

Las distintas líneas y condiciones celulares se sembraron a una densidad de 5×10^3 células en una placa de 96 pocillos (XF96, Seahorse) y se mantuvieron durante 24h en condiciones normales de cultivo. A las 24h se equilibró la placa sensora de 96 electrodos (XF sensor cartridge hydration, Seahorse) con 200μl de solución de calibración a pH 7,4 (Seahorse Bioscience calibrant, Seahorse) mediante incubación a 37°C en ausencia de CO₂ en una cámara de preparación (PrepStation, Seahorse). Por otro lado se preparó medio de cultivo sin suero y bicarbonato para evitar el efecto tampón que ejercen estos compuestos sobre la acidificación del medio.

Para las medidas de glucólisis se reemplazó el medio completo de las placas XF96 por el medio “XF Assay Medium” (medio no tamponado) suplementado con 1mM de piruvato sódico y 25mM de glucosa. Para las medidas de β-oxidación el medio se reemplazó por el medio “XF Assay Medium” suplementado con 1mM de piruvato sódico, 0,5mM de L-carnitina y 50μM de Palmitato. Las placas se incubaron en la cámara de preparación durante 30 min. a 37°C en ausencia de CO₂.

Para inducir el bloqueo de la fosforilación oxidativa mediante la inhibición de la fracción FO de la ATP sintasa se usó 10µM de oligomicina (Seahorse), 0,25µM de carbonylcyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) para desacoplar la cadena de transporte de electrones, y 8µM de rotenona y antimicina para la inhibición de la cadena de transporte de electrones.

La obtención de las medidas se realizó adaptando la placa sensora ya calibrada a la placa de cultivo, que se introdujo en el analizador “Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer” (Seahorse) para proceder con las medidas de consumo de oxígeno y acidificación del medio.

5.5. Análisis metabólico extra e intracelular.

Para analizar las posibles diferencias en el interior y exterior de las células, estas se analizaron mediante estudios de metabolómica a través de técnicas de espectrometría.

5.5.1. Obtención de los extractos.

El extracto intracelular se obtuvo de las células en cultivo que fueron recogidas por raspado mediante un raspador (del inglés “*scraper*”) y se resuspendieron en metanol frío y mantuvieron en hielo seco tras una agitación de 1 min. Las muestras fueron sometidas a ciclos de congelación-descongelación para obtener una lisis celular completa: 10 min. a 4°C, 10 min. en nitrógeno líquido y 10 min. a 4°C. Tras los ciclos de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 5725 g durante 5 min. a 4°C y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -80°C hasta su análisis.

El medio fue recogido del cultivo celular y mantenido a -80°C hasta su análisis.

5.5.2. Análisis de metabolitos por cromatografía.

Los extractos y el medio de cultivo fueron analizados mediante LC-MS y GC-MS. Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases (GC-EI-Q-MS, del inglés “*Gas chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization-time-of-flight mass spectrometry*”) y por cromatografía líquida (UHPLC-ESI-MS-QTOF del inglés, “*ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method*”). Se llevó a cabo un análisis estadístico adecuado y se identificaron las variables estadísticamente significativas (p-valor < 0,05). Para los datos GC-MS, los metabolitos se identificaron mediante tiempos de retención, comparando el índice de retención y los patrones de fragmentación de masas con las disponibles en las bibliotecas; *NIST mass spectral library 2008* y *Fiehn RTL library* (Agilent Technologies). Se utilizaron controles de calidad (QC del inglés *Quality*

control) en ambas técnicas. Las muestras fueron inyectadas y analizadas como se describe (Canuto et al., 2014, Moreno et al., 2014).

6. ESTUDIO TELOMÉRICO

6.1. mFISH (metaphase Fluorescence In Situ Hybridization).

Para la realización del FISH en metafase se utilizaron sondas PNA (*Peptide Nuclei Acid*) análogas de ADN en la que se ha remplazado el esqueleto de desoxirribosa-fosfato con un péptido sintético compuesto normalmente de unidades de N-2 amino etil-glicina y acoplados a un marcador fluorescente (Nielsen, 2001). Particularmente, para llevar a cabo este estudio, se usó una sonda PNA de secuencia LL(CCCTAA)3 (Eurogentec, Liège, Belgium) específica para las regiones teloméricas y conjugada con Cy3.

6.1.1. Preparación de las muestras.

Para la obtención de metafases procedentes de los cultivos de ASCs, se trataron las células en sub-confluencia (70-80%) con 10µg/ml de colcemida (Invitrogen) durante 4h a 37°C. Tras este periodo, las metafases se recogieron mediante tripsinización y se trataron en suspensión con una solución hipotónica de KCl al 0,56% durante 15 min. a 37°C. Una vez realizado el choque hipotónico, las metafases fueron fijadas tres veces por 5 min. en metanol:ácido acético glacial en proporción 3:1 a 4°C y se guardaron a -80°C hasta su uso. Una vez fijadas, las metafases se tiraron gota a gota sobre portaobjetos limpios (Deltalab, Barcelona, España) con una película de agua destilada para favorecer la disgregación de los cromosomas y de este modo facilitar su captura. Una vez en el portaobjetos, las metafases se dejaron secar sobre el cristal al menos una noche a TA. Transcurrido este tiempo, las muestras se hidrataron con PBS 1X durante 15 min. a TA, se fijaron en una solución al 4% formaldehído/PBS durante 2 min. a TA y se lavaron 3 veces en PBS durante 5 min. a TA. Para eliminar los restos de proteína y de membrana que pudiesen interferir con la posterior hibridación, las muestras se incubaron con una solución de pepsina ácida al 0,1% (Sigma) y HCl al 0,03% durante 10 min. a 37°C. A continuación, las muestras se lavaron 2 veces con PBS a TA, se fijaron nuevamente en 4% formaldehído/PBS durante 2 min, se lavaron 3 veces en PBS y se deshidrataron en soluciones seriadas de etanol al 70%, 90% y 100% durante 5 min. a TA. Las preparaciones se dejaron secar 10 min. a TA para posteriormente continuar con la hibridación.

6.1.2. Desnaturalización/hibridación in situ.

Para la hibridación, se añadieron 2 gotas de 15µl de la mezcla de desnaturalización/hibridación (10mM Tris HCl pH 7,2, 70% formamida desionizada, 0,5% de reactivo de bloqueo, 0,5µg/ml de sonda PNA-tel-Cy3 y 5% de tampón Mg con 25mM de MgCl₂, 9mM ácido cítrico, 82mM de Na₂HPO₄) sobre un cubreobjetos de 60x20mm (Menzel-glaser, Braunschweig, Alemania). El cubreobjetos se depositó sobre las preparaciones y se incubaron durante 3 min. a 80°C, para permitir la desnaturalizaron. Inmediatamente después, para permitir la hibridación, las preparaciones se dejaron en una cámara húmeda durante toda la noche a TA en oscuridad. Al terminar la hibridación, las preparaciones se lavaron 3 veces en PBS-0,1%Tween20 durante 10 min. a 60°C y se sometieron a una segunda ronda de deshidratación como se describió anteriormente. Finalmente las preparaciones se dejaron secar durante 5 min. a TA y se contra tiñeron los cromosomas con el medio de montaje Vectashield H-1200 con DAPI (Vector laboratories). Los portaobjetos se guardaron a 4°C en la oscuridad hasta la captura digital de las imágenes. Se capturaron de forma aleatoria al menos 25 metafases o núcleos por muestra.

6.1.3. Captura de imágenes.

Las imágenes fueron captadas a través de un microscopio confocal Leica DM2500 – TSC SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con un objetivo 40x de inmersión de aceite con los filtros apropiados. Cada uno de los canales de fluorescencia se captó por separado y el programa generó automáticamente una imagen combinada de los canales captados. Se capturaron al menos 25-30 metafases o núcleos por cada condición, el mismo día y con el mismo tiempo de exposición.

6.1.4. Cuantificación de fluorescencia telomérica.

La cuantificación de la señal telomérica se realizó usando el programa informático TFL-Telo versión 2 (Laboratorio Dr.Peter Lansdrop en el “*British Columbia Cancer Center*” en Vancouver, Canadá). La longitud telomérica se obtuvo como medida directa de la intensidad de fluorescencia emitida por la tinción telomérica.

6.2. Análisis de la actividad telomerasa - Ensayo TRAP.

Para la realización del protocolo de detección de actividad telomerasa mediante la amplificación de regiones teloméricas por el sistema de PCR cuantitativa.

6.2.1. Amplificación telomérica.

Para este ensayo se generaron extractos proteicos de cada uno de los cultivos. Las células se levantaron por tripsinización, se lavaron dos veces en PBS a 4°C y los precipitados celulares (*pellets*) se resuspendieron en el buffer de lisis NP40 (10mM Tris-HCl a pH 8.0, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1%NP40, 0,25mM deoxicolato de sodio, 10% glicerol, 150mM NaCl, 5mM β-mercaptoetanol e inhibidor de proteasas). El homogenizado se incubó durante 30 min. en hielo y posteriormente se centrifugó a 16000g 20 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido se guardó a -80°C hasta su posterior uso. Se usaron 5μl de cada extracto para la cuantificación proteica usando el kit de detección de proteínas “*DC Protein assay*” (BIO-RAD, Hercules, CA, US).

Para determinar la concentración proteica en cada una de las muestra, se midió la absorbancia del sobrenadante a 650nm mediante el uso del kit “*DC Protein Assay*” (Bio-Rad, Hercules, CA, US) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cuantificar la concentración proteica absoluta, se realizó una recta patrón de absorbancia a 650nm con diluciones seriadas de concentraciones de albúmina de suero bovino conocidas (BSA, *Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) y se interpolaron las medidas de absorbancia obtenidas en cada una de las muestras problema.

Conociendo la concentración proteica en cada extracto, se usaron entre 5 y 1μg de proteína por ensayo junto con un control negativo con 5μg de proteína inactivada por calor incubando los extractos durante 10 min. a 80°C. A cada muestra se le añadió 5μl de mezcla de reacción de amplificación telomérica compuesta por tampón 10x de actividad telomerasa (500mM Tris AcH a pH 8,5, 500mM AcK, 30mM MgCl₂, 10mM spermina, 10mM EGTA y 50mM β-mercaptoetanol), 2mM dAGT (Sigma-Aldrich) y 1mM oligo TS y se incubaron durante 1h a 30°C.

6.2.2. Cuantificación de la amplificación telomérica.

Para cuantificar la amplificación telomérica mediada por la telomerasa endógena de cada uno de los extractos, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que amplificaba el producto obtenido de la reacción anterior. Para este fin, se añadieron 2μl de la reacción de amplificación telomérica a 23μl de una mezcla de reacción de qPCR que contenía tampón 1 x *PCR Master Mixpower SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), 5mM EGTA, 4ng/μl Oligo ACX y 2ng/μl Oligo TS. La reacción de PCR se realizó durante 40 ciclos, en los que cada ciclo correspondía a una oscilación de cambios de temperatura de 94°C por 10 min. (Iniciación), 94°C por 15 segundos (Desnaturalización) y 60°C por 1min (Alineamiento y extensión). La reacción de PCR se realizó mediante un termociclador “*ABI PRISM 7700 sequence detection*” (Applied Biosystems) y se monitorizó y analizó a través del

programa informático SDS 2.0 (Applied Biosystems). Se realizaron tres réplicas de todas las reacciones de amplificación incluidos los controles negativos.

7. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA

7.1. Aislamiento de ARN.

Para el aislamiento del ARN, las células sembradas se levantaron por tripsinización, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1ml de TRIzol Reagent (Invitrogen) que se recolectó en un eppendorf de 1,5ml. Tras una incubación de 5 min. a TA se añadió 0,2ml de cloroformo y se agitó suavemente. La mezcla se incubó por 8 min. a TA y se centrifugó durante 15 min. a 12000 rpm a 4°C. Después de la centrifugación, la fase acuosa se separó del resto de la mezcla en un nuevo tubo Eppendorf y se agregó 0,5ml de alcohol isopropílico, incubándose por 10 min. a TA. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 10 min. a 12000rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70% para seguidamente centrifugar a 8000rpm durante 5 min. a 4°C. Nuevamente el sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó secar durante 10 min. para después resuspenderlo en 50µl de agua libre de enzimas degradadoras de ARN (RNAsa free). El ARN se cuantificó a 260nm mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

7.2. RT-PCR

Para la síntesis de ADNc (ADN copia) a partir del ARN aislado, se utilizó el kit comercial de transcripción reversa "*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" (Life Technologies). Brevemente, se añadió 1µg de ARN a una mezcla de reacción que contenía 2µl de un tampón estándar (RT Buffer), 2µl de cebadores aleatorios 10nM, una mezcla de desoxinucleótidos de adenina, timidina, guanina y citosina (dNTP, (Sigma-Aldrich)) y 1µl de Multiscript RT (Life technologies) con agua *ARNsa free* en un volumen final de 20µl. Seguidamente, la mezcla de reacción se calentó durante 10 min. a 25°C, 2h a 37°C, 5 min. a 85°C y finalmente un 1 min. a 4°C.

7.3. qRT-PCR

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica de ARN, se utilizaron los siguientes cebadores específicos para cada uno de los genes en cuestión (tabla 2). Una vez generado el cADN se añadió 1µl de la muestra a una mezcla de reacción compuesta por 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y

1µl de los cebadores específicos para cada uno de los genes a estudiar, en un volumen final de reacción de 10µl. La reacción de PCR se realizó durante 40 ciclos, en los que cada ciclo correspondía a una oscilación de cambios de temperatura de 95°C por 10 min. (desnaturalización inicial), 94°C por 15 segundos (desnaturalización) y 60°C por 1min (alineamiento y extensión). La reacción de PCR se realizó mediante un termociclador “ABI PRISM 7700 sequence detection” (Applied Biosystems) y se monitorizó y analizó a través del programa informático SDS 2.0 (Applied Biosystems). Se realizaron réplicas triples por cada muestra analizada.

GEN	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
<i>IRS-1</i>	CTTCTGTCAGGTGTCCATCC	CTCTGCAGCAATGCCTGTTC
<i>IRS-2</i>	ACAATGGTGACTACACCGAG	CTGCTTTTCTGAGAGAGAC
<i>PTEN</i>	AATCCCAAGTCAGAGGCGCTATGT	GATTGCAAGTTCGCCACTGAACA
<i>PerA</i>	GGCCTGGACGACAAAACC	CAGGATGGGCTCCATGAC
<i>PPAR-γ</i>	ATTGACCCAGAAAGCGATTC	CAAAGGAGTGGGAGTGGTCT
<i>aP2</i>	AACCTTAGATGGGGGTGTCTG	TCGTGGAAGTGACGCCCTTC
<i>Pref-1</i>	AGCTGGCGGTCAATATCATC	AGCTCTAAGGAACCCCGGTA
<i>C/EBP-α</i>	TTACAACAGGCCAGGTTTCC	CTCTGGGATGGATCGATTGT
<i>C/EBP-β</i>	ACCGGGTTTCGGGACTTGA	GTTGCGTAGTCCCCTGTCCA
<i>mTet1</i>	AGCTACCCTGAGTTTCACCC	CAATTAGGCGCTGTCTGTCC
<i>hTet1</i>	CCAGTGAAAGAGGCATCTCC	TCTTCAGTGGAGCTGGTGTG
<i>mTet2</i>	TAGCTTTGCGTCAGTGGAGA	AGGGATGGCTGGCTCAAAA
<i>hTet2</i>	GCTGGAGCACAAGTCACAAA	GAGAAGTGACCTGGTGTGA
<i>mTet3</i>	TTCCCTACCTGCGATTGTGT	AGAACTCTTCCCCTCCTTGC
<i>hTet3</i>	CCCAGAGCTCCAACTGCTAC	ACAGAGGTGTCTTGCCCATC
<i>mNanog</i>	CTTACAAGGGTCTGCTACTGAGATGC	TGCTTCCTGGCAAGGACCTT
<i>hNanog</i>	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG	CTGCGTCACACCATTTGCTATTCT
<i>mOct4</i>	TCTTCTGCTTCAGCAGCTTG	GTTGGAGAAGGTGGAACCAA
<i>hOct4</i>	CGAAAGAGAAAGCGAACCAGTAT	AGCAGCCTCAAAACCTCTCGTT
<i>mSox2</i>	AAAGCGTTAATTTGGATGGG	ACAAGAGAATTGGGAGGGGT
<i>hSox2</i>	GTCATTTGCTGTGGGTGATG	AGAAAAACGAGGGAAATGGG
<i>HIF1α</i>	CGTTCCTTCGATCAGTTGTC	TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT
<i>mp53</i>	TCCGACTGTGACTCCTCCAT	CTAGCATTAGGCCCTCATC
<i>hp53</i>	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	GGTACAGTCAGAGCCAACCT
<i>mp21</i>	CAAAGTGTGCCGTTGTCTCT	AAGTACTGGGCCTCTTGTC
<i>hp21</i>	CCCAAGCTCTACCTTCCAC	CTGAGAGTCTCCAGGTCCAC
<i>β-Actin</i>	CACGATGGAGGGGCCGACTCAT	TAAAGACCTCTATGCCAACACAG

Tabla 2. Secuencias de los cebadores para RT-PCR.

8. WESTERN BLOT

8.1. Aislamiento y cuantificación proteica.

Para realizar la extracción proteica, los cultivos celulares en sub-confluencia (70-80%) se lavaron rápidamente dos veces con PBS a 4°C y posteriormente se lisaron mediante la adición directa de 10µl/cm² de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50mM pH 7,4, 0,1% Triton X-100, 0,25% deoxicolato sódico, NaCl 150mM, EDTA 1mM e inhibidores de proteasas “*mini complete*” (Roche, Basilea, Suiza)) por superficie cultivada. Tras 2 min. de incubación a 4°C, el extracto proteico se procesó rascando homogéneamente la superficie de la placa mediante un rascador celular (BD Biosciences). El lisado celular se recolectó en un eppendorf de 1,5ml y seguidamente se incubó durante 30 min. a 4°C. Para descartar los restos sub-celulares, el extracto de lisis se centrifugó a 16000Xg durante 20 min. a 4°C y el sobrenadante fue alicuotado y guardado a -80°C hasta su uso.

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6x (375mM Tris-HCl pH 6,8, 12% SDS, 30% glicerol, 10%β-mercaptoetanol, 0,075% azul de bromofenol) y se desnaturalizaron por choque térmico a 100°C, 5 min. y 4°C, 1 min.

8.2. Electroforesis, transferencia, incubaciones y revelado.

Los extractos proteicos (15µl de muestra) fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) a un porcentaje de 10 o 12% dependiendo de la proteína a analizar y se transfirieron a una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,45µm (Millipore, Bellirica, MA, US). Dicha transferencia se realizó en condiciones húmedas a un voltaje constante de 80V durante 1 h y 30min. Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución al 10% de leche desnatada en PBS durante 1 h a TA; periodo tras el cual, la membrana se incubó con los respectivos anticuerpos primarios en una solución de PBS durante toda la noche a 4°C (tabla 3). Tras la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-0,1%Tween20 durante 5 min. y se incubaron durante 1 h a TA con los respectivos anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP, *Horse radish peroxidase*, Dako, Carpinteria, CA, US) y diluidos en una solución de PBS 1:10000. Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces con PBS-0,1%Tween20 durante 5 min. a TA y para llevar a cabo el revelado, la membrana se incubó con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (GE Helthcare) durante 1 min. a TA. Transcurrido este tiempo, se situó la membrana en un casete de revelado junto con

una película radiográfica (AGFA, Mortsel, Belgium) durante 30, 60, 120 o más segundos y se reveló mediante la máquina de revelado Kodak x-Omat 2000.

La relación de anticuerpos primarios utilizados para este ensayo y sus respectivas diluciones de uso se encuentra resumida en la tabla 3.

Antígeno	Dilución	Casa comercial
Anti-Nanog	1/1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Hif 1 α	1/1000	Novus Biologicals, Littleton, CO, EEUU
Anti- β Actin	1/1000	Abcam, Cambridge, UK

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la detección de por citometría de flujo.

9. HIDROXIMETILACIÓN DEL ADN

9.1. Aislamiento de ADN.

Para el aislamiento del ADN, las células sembradas se levantaron por tripsinización, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1ml de TRIzol Reagent (Invitrogen) que se recolectó en un eppendorf de 1,5ml. Tras una incubación de 5 min. a TA se añadió 0,2ml de cloroformo y se agito suavemente. La mezcla se incubó por 8 min. a TA y se centrifugó durante 15 min. a 12000 rpm a 4°C. Después de la centrifugación, la fase acuosa se separó del resto de la mezcla en un nuevo tubo eppendorf para el aislamiento del ARN. A la mezcla rosa se agregó 0,3ml de etanol absoluto y se mezcló por inversión, incubándose por 2 min. a TA. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 5 min. a 2000rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70% incubándose durante una noche a -20°C. Seguidamente se centrifugó a 2000rpm durante 5 min. a 4°C. Nuevamente el sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó secar durante 10 min. para después resuspenderlo en 50 μ l tampón Tris-EDTA. El ADN se incubó a 56°C durante 30 min. para facilitar su resuspensión y se cuantificó a 260nm mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

9.2. Inmunodetección de grupos 5hmC.

Para la inmunodetección de los grupos 5-hidroximetilcitosina, se utilizó el kit comercial “*EpiSeeker hydroxymethylated DNA Quantification Kit Colorimetric*” (Abcam). Brevemente, se utilizaron 200ng de ADN por reacción que se mezclaron con

la solución de unión para facilitar la adhesión de las muestras al pocillo de la placa comercial. Se incubó a 37°C durante 90 min. Transcurrido ese tiempo se realizó la captura del DNA hidroximetilado con el anticuerpo del kit y se detectó la cantidad mediante el cambio de color.

Para cuantificar la cantidad de 5-hmC absoluta, se realizó una recta patrón para la que se utilizó una solución de ADN de concentración conocida y se interpolaron las medidas de absorbancia obtenidas en cada una de las muestras problema. La lectura de absorbancia se realizó a 450nm.

10. ESTUDIO DE RECUPERACIÓN METABÓLICA

10.1. Aislamiento de las fracciones.

Para el aislamiento de la fracción citosólica a partir de 1×10^6 células se utilizó el kit "*Complete Cell Fractionation kit*" (BioVision, Milpitas, CA). Brevemente, las células se levantaron por tripsinización y el pellet se resuspendió en 1ml de PBS frío que se recolectó en un eppendorf de 1,5ml. Posteriormente se centrifugó a 700xg durante 5 min. a 4°C. Tras descartar el sobrenadante el pellet se resuspendió en 0,4ml del tampón de extracción citosólico que contiene previamente el cocktail inhibidor de proteasas. La mezcla se homogeneizó por pipeteo y se incubó en hielo durante 20 min. Para seguidamente centrifugar a 700 g durante 10 min. a 4°C y recoger el sobrenadante que contiene la parte citosólica de las células. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

10.2. Transferencia de la fracción citosólica.

Para la transfección de las células con la fracción citosólica, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células en placas multipocillo de 24 pocillos y se utilizó el kit "*Lipid-based protein-capture reagent Pro-DeliverIN*" (OZ Biosciences, Marseille, France). Brevemente, se utilizaron 15 µl de la fracción citosólica que fueron mezclados con el reactivo "Pro-DeliverINTM" e incubados 15 min. a TA. A continuación se reemplazó el medio completo de los pocillos por la mezcla proteica resuspendida en DMEM sin suero. Las células fueron incubadas en condiciones estándar de cultivo, monitorizándose la viabilidad celular tras la transfección.

11. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Las representaciones gráficas se expresan como la media aritmética de valores de entre 3-5 experimentos independientes y su error estándar de la media (S.E.M.). En experimentos en los que se utilizan auto radiografías, se emplearon diferentes tiempos de exposición para asegurar que las bandas no estaban saturadas y posteriormente se cuantificaron por análisis densitométrico.

Para determinar el grado de significación estadística, se ha utilizado el análisis de varianza, ANOVA. Una obtenido el grado de significación de la diferencia correspondiente, se considera significativo a partir de $p < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Aislamiento y caracterización de ASC de tejido adiposo.

Las células fueron aisladas mediante la técnica del explante (Bernal et al., 2012a, Galvez et al., 2009), siguiendo el protocolo detallado en materiales y métodos (pág. 57). Las muestras de tejido adiposo obtenidas de grasa subcutánea de ratones y humanos se fragmentaron, y se seleccionaron aquellos con un mayor número de vasos sanguíneos. Tras 7 días de cultivo se puede observar la aparición de células redondeadas (figura 1). Estas células fueron pre-seleccionadas, expandidas y mantenidas en condiciones estándar de cultivo. A lo largo del proceso de expansión se evaluaron diversos parámetros que se describirán a continuación.

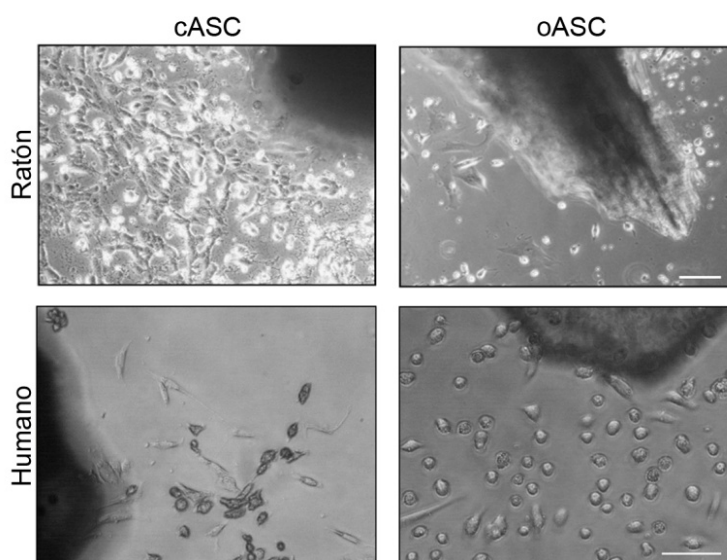


Figura 1. Aislamiento de precursores de tejido adiposo. ASCs emergiendo del explante de tejido adiposo de ratón y humano control (cASC) y obeso (oASC). Barra de escala, 150µm.

1.1 Caracterización fenotípica.

Las células obtenidas de los explantes fueron caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo para la expresión de antígenos de superficie específicos de células madre mesenquimales (CD45, CD34, CD44 y Sca1). Se confirmó que todas las líneas celulares obtenidas eran positivas para CD34, CD44, Sca-1 y negativas para CD45 descartando un linaje hematopoyético y presentando el patrón característico de las células madre mesenquimales de tejido adiposo (Rodeheffer et al., 2008) (figura 2).

Antígeno	Ratón		Humano	
	cASCs	oASCs	cASCs	oASCs
CD45 (%)	8,4	6,5	1,4	1,2
CD34 (%)	73,6	70,5	97,5	98,2
CD44(%)	72,7	67,5	99,1	99,3
Sca-1 (%)	70,4	66,1	87,4	81,2

Figura 2. Caracterización fenotípica de las ASCs. La tabla muestra la media de intensidad de los antígenos de superficie marcados con fluorescencia de cinco experimentos independientes.

2. Estudio de la capacidad de diferenciación de las ASC.

Se estudió la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células hacia los diferentes linajes mesenquimales (óseo, adiposo y cartílago). Esta capacidad de formar célula diferenciadas, mediante la exposición a agentes inductores en cultivo, se confirmó mediante las distintas tinciones específicas (pág. 59, material y métodos) y se cuantificó el porcentaje de diferenciación hacia los distintos linajes. En ambos modelos, ratón y humano, las células son capaces de formar tejido adiposo, óseo y de cartílago (figura 3). Sorprendentemente, aunque tanto las células control como las obesas pueden dar lugar a adipocitos, el porcentaje de adipocitos formado por las células de individuos obesos es significativamente menor.

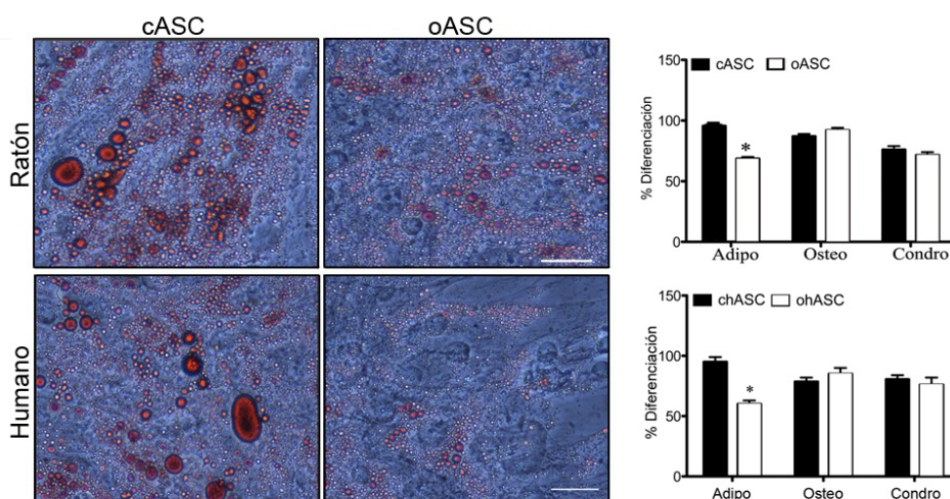


Figura 3. Diferenciación de las ASC a los distintos linajes mesenquimales. Las células de ratón (panel superior) y de humano (panel inferior) inducidas a diferenciación hacia tejido adiposo (Adipo), osteogénico (Osteo) y condrogénico (Condro). Imágenes representativas de la tinción con aceite rojo O para tejido adiposo (n = 5). Barra de escala, 30µm. Porcentaje de diferenciación a adipocitos en las ASCs. *p <0,05.

2.1. Propiedades metabólicas de los adipocitos derivados de las ASCs.

Las células madre residentes en el tejido adiposo, son las encargadas de la renovación y el mantenimiento de este. Se ha observado que estas células presentan una capacidad disminuida para formar adipocitos maduros, por lo que se procedió a evaluar la funcionalidad y las características metabólicas de estas células.

2.1.1. Formación de vesículas en las ASCs.

Dado que una de las principales funciones de los adipocitos es la acumulación de lípidos, se llevó a cabo el análisis del contenido lípido y de triglicéridos en las ASCs, en el modelo de ratón, durante el proceso de diferenciación adipogénica. Los resultados muestran una disminución del 50% en la cantidad de lípidos y triglicéridos acumulados en las oASCs durante el periodo de diferenciación, comparado con las cASCs (figura 4 A y B).

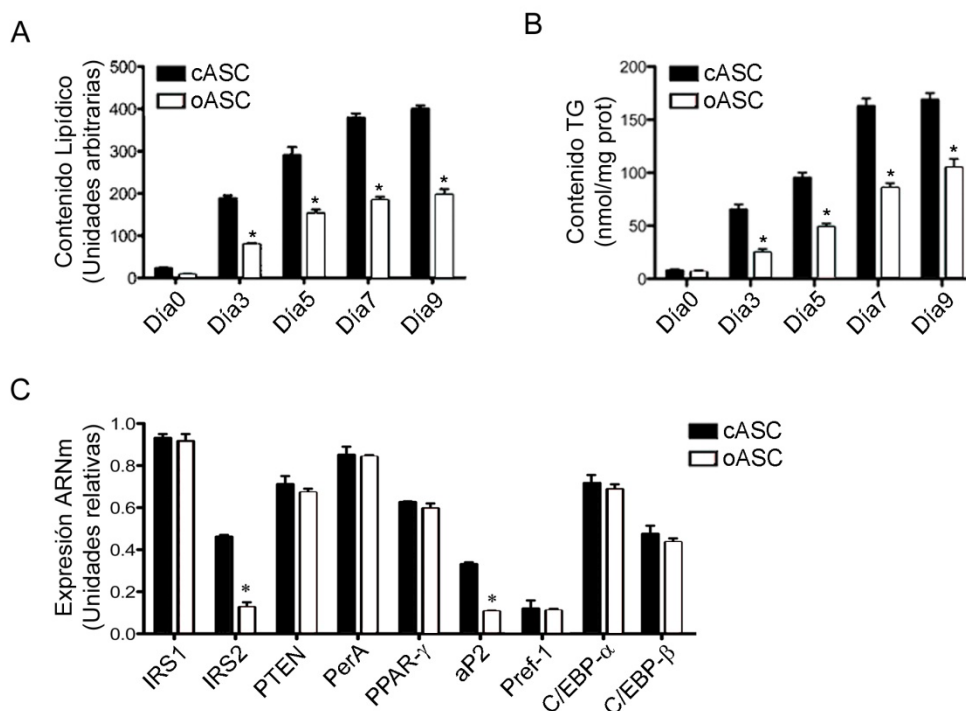


Figura 4. Estudio bioquímico de los adipocitos derivados de las ASC. Cuantificación del contenido en lípidos (A) y triglicéridos (B) durante el proceso de diferenciación a adipocitos derivados de las ASC de ratón. Perfil de expresión de marcadores adipogénicos a los 7 días de diferenciación adipogénica: *IRS1*, Sustrato 1 del receptor de la insulina; *IRS2*, Sustrato 2 del receptor de la insulina; *PTEN*, Homólogo de la fosfatasa y tensin; *PerA*, Factor 1 de preadipocitos; *PPAR- γ* , Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas; *aP2*, Proteína de unión a ácidos grasos; *Pref-1*, Factor de preadipocitos 1; *C/EBP- α* y *C/EBP- β* , Proteína de unión alfa y beta al activador CCAAT. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de cinco experimentos independientes. *p < 0,03.

Para confirmar las diferencias entre las dos poblaciones en el proceso de formación de adipocitos se analizó la expresión de un conjunto de marcadores adipogénicos (Figura 4C). No se encontraron diferencias en la expresión de genes como el Sustrato 1 del receptor de la insulina (*IRS1*) o el Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPAR-γ*). Sin embargo, sí se observa una reducción en la expresión del Sustrato 2 del receptor de la insulina (*IRS2*) y la Proteína de unión a ácidos grasos (*aP2*) en las oASCs comparado con las cASC.

En conjunto los resultados muestran que las ASCs derivadas de un ambiente obeso, presentan una capacidad disminuida para formar adipocitos correctamente en comparación con las células derivadas de ambientes no obesos.

2.1.2. Deterioro en la captación de glucosa en las ASCs de obesos.

Se ha visto, que la diferenciación de las oASC conduce a la formación de adipocitos parcialmente inmaduros. Una de las principales funciones de los adipocitos, es actuar como reserva energética, por lo que se llevó a cabo el análisis de la captación de glucosa en respuesta a la insulina. Se analizó la capacidad de los adipocitos derivados de las ASC de ratón para captar glucosa en condiciones basales (Ins-) y mediante la estimulación con insulina (Ins+) (Figura 5 A).

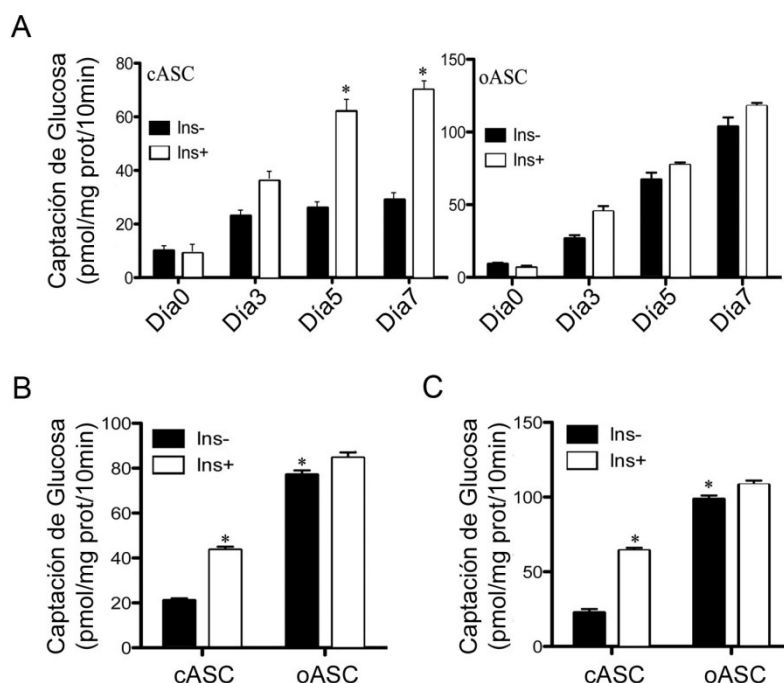


Figura 5. Análisis del metabolismo de la glucosa en la diferenciación adipogénica. Captación de glucosa estimulada por insulina durante la diferenciación adipogénica de las ASC de ratón (A). Las células fueron estimuladas con 10nmol/L de insulina (Ins) durante 30 minutos.* $p < 0,01$. Captación de glucosa en ASC de ratón (B) y de humano (C) a los 7 días de la diferenciación adipogénica. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de cinco experimentos independientes. * $<0,03$.

Los resultados muestran que la insulina incrementa la captación de glucosa en las cASCs, provocando una estimulación máxima 3 veces superior a los 7 días de la diferenciación (figura 5 A). Por el contrario, la presencia de insulina en las oASC no produce efectos adicionales, lo que indica que no existe una respuesta a la insulina en estas células. Además, cuando se estudian los niveles basales de captación de glucosa a los 7 días de diferenciación, las oASCs presentan una captación de glucosa hasta 5 veces mayor que las cASC, tanto en el modelo de ratón (figura 5 B) como en el humano (figura 5 C).

2.1.3. Perfil de secreción de citoquinas alterado en las oASCs.

Otra de las funciones importantes del tejido adiposo es su capacidad de secretar diversos factores, denominados adipoquinas, ya que actúa también como órgano endocrino. Por ello, se analizó el perfil de secreción de adipoquinas a los 7 días de la diferenciación de las ASC (pág. 62, material y métodos), observándose que el contenido de adiponectina en el medio de los adipocitos derivados de las cASC es superior al de los derivados de las oASCs. Por el contrario, los niveles de MCP-1 y TNF- α están aumentados en las oASC respecto a las cASCs, tanto en las células de ratón (Figura 6 A) como en las de humano (Figura 6 B).

Estos resultados confirman que existe un patrón de secreción de adipoquinas alterado en las oASCs, por lo que la respuesta fisiológica de estas células esta afectada.

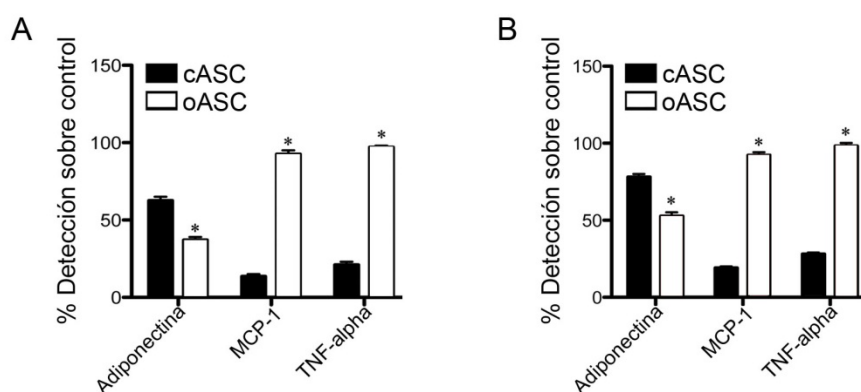


Figura 6. Perfiles de secreción de adipoquinas en las ASC. Detección en el medio de cultivo de citoquinas secretadas por las ASC de ratón (A) y de humano (B). Se representa el porcentaje de detección de las células a los 7 días de la diferenciación comparado con las ASC no diferenciadas. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de seis experimentos independientes. *p < 0,03.

2.1.4. Recuperación del fenotipo mediante transferencia citosólica.

Durante la obesidad son los factores ambientales debido al incremento de la inflamación y el efecto del metabolismo los que modulan el nicho de las células en el tejido. Para comprobar si los factores secretados por las células control podrían modular la respuesta de las células obesas, se llevó a cabo el cultivo de los adipocitos derivados de obesos durante 24 h en el medio condicionado de los adipocitos derivados de las cASC (cCM) a distintos intervalos de la diferenciación. Ninguno de los medios condicionados de las células cASC (cCM) incrementa la captación de glucosa en los adipocitos derivados de las oASCs (figura 7 A). En el experimento contrario, adipocitos derivados de no obesos cultivadas con medio condicionado de oASC (oCM), se observa una disminución en la capacidad de captación de glucosa (figura 7 B). Estos resultados indican que los factores secretados por los adipocitos derivados de las oASC son capaces de inducir una resistencia a la insulina en los adipocitos derivados de las cASC. Sin embargo, los factores que secretan los adipocitos derivados de las cASC no son capaces de restaurar el fenotipo de las células obesas.

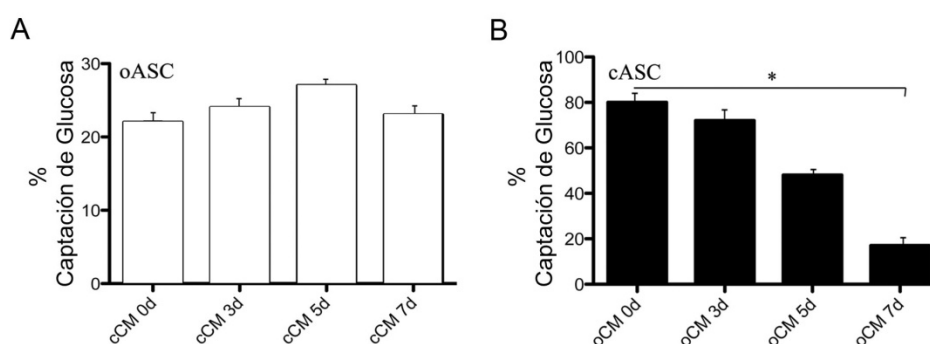


Figura 7. Efecto del medio condicionado en la captación de glucosa. Cuantificación de la captación de glucosa estimulada por insulina (100nmol/L, 30min). Las células derivadas de oASC fueron cultivadas en medio condicionado de cCM (A) y las células derivadas de cASC con el medio condicionado oCM (B) durante 24 h. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de ocho experimentos independientes. * $p < 0,01$.

Se ha observado que el medio de las células obesas condiciona la sensibilidad a la insulina de las cASCs, por lo que podrían estar activándose señales internas que determinan el fenotipo de los adipocitos derivados de las oASCs. Con esta premisa, se estudió la posibilidad de reprogramación celular mediante un nuevo enfoque, el uso de fracciones celulares aisladas de las cASCs y transferidas a las oASC antes de la diferenciación celular (Figura 8 A). Las fracciones fueron obtenidas mediante el kit de fraccionamiento celular (pág. 72, material y métodos) y cada fracción fue testada mediante geles de agarosa y western blot para definir los productos mayoritarios de

cada componente. Así, la fracción nuclear (FN) fue positiva para ADN y para la proteína SP1 (proteína de unión a ácidos nucleicos), mientras que en la fracción citosólica (FC) se detectó la proteína GADPH (Figura 8 B). Para llevar a cabo la transfección se utilizó el kit “*Pro-deliverIN lipid protein-capture reagent*” (pág. 72, material y métodos). La transfección de la FC resultó ser la más efectiva, no presentó ningún efecto tóxico en la viabilidad o proliferación celular, por lo que fue la seleccionada para la evaluación metabólica. Las oASCs modificadas con la FC (mASC) fueron cultivadas para evaluar la capacidad adipogénica que presentaban tras la modificación, observándose que las mASC recuperan la capacidad de formar adipocitos maduros y la acumulación lipídica es mayor que en las oASC (figura 8 C).

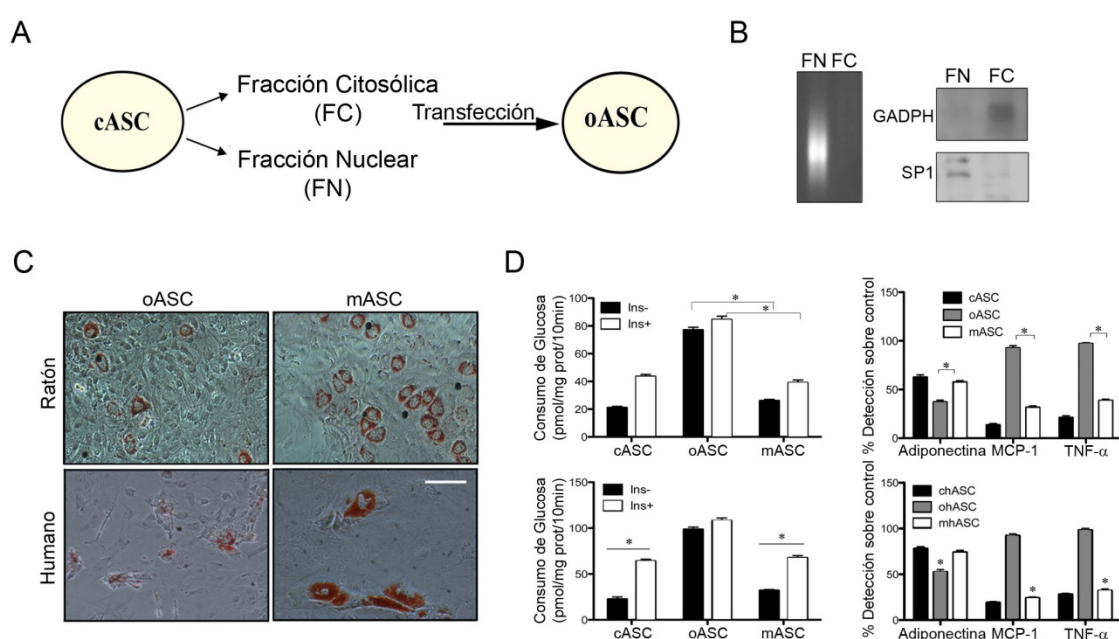


Figura 8. Modificación de las oASC mediante fracciones subcelulares de las cASCs. Esquema del proceso para la modificación de las oASC mediante fracciones subcelulares (A). Análisis de los componentes mayoritarios de las fracciones celulares mediante geles de agarosa, para ADN, y western blot, para GADPH y SP1 (B). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Tinción con aceite rojo de la diferenciación adipogénica de las oASCs y de las mASC de ratón y humano (C). Barra de escala 50 μ m. Análisis tras 7 días de la diferenciación adipogénica de la captación de glucosa en respuesta a la insulina de las cASCs, oASCs y mASCs (D, panel izquierdo) para las ASC de ratón (panel superior) y de humano (panel inferior). Producción de Adiponectina, MCP-1 y TNF- α de las células diferenciadas a los 7 días respecto a las no diferenciadas (D, panel derecho) para las ASC de ratón (panel superior) y de humano (panel inferior). Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de seis experimentos independientes. * $p < 0,02$.

Para evaluar la importancia de la recuperación adipogénica, se procedió a analizar la captación de glucosa como indicador de funcionalidad en las ASCs (Figura

8 D, panel izquierdo). Sorprendentemente, los adipocitos derivados de las mASCs presentan una disminución en la captación de glucosa y una respuesta a la insulina similar a las cASCs. El análisis del perfil de secreción de citoquinas (Figura 8 D, panel derecho) revela un aumento en la secreción de adiponectina y una reducción en la producción de MCP-1 y TNF- α en comparación con las oASCs.

Estos resultados sugieren una recuperación del fenotipo de las oASCs cuando son transfectadas con la fracción citosólica de células control, así como una restauración en la sensibilidad a la insulina en las oASC.

3. Efecto de la obesidad en la funcionalidad de las células madre de tejido adiposo.

Con el fin de estudiar las propiedades funcionales de las células madre del tejido adiposo bajo condiciones de obesidad, se evaluó la capacidad de migración, invasión y angiogénesis de las células mediante ensayos de transwell y matrigel respectivamente. Estas propiedades son importantes y necesarias para el avance de las células madre por los tejidos y para mantener su capacidad regeneradora en los puntos necesarios.

3.1. La obesidad reduce la capacidad de migración de las ASCs.

Se procedió a analizar la capacidad de migración mediante ensayo transwell de las ASCs en condiciones estándar de cultivo y bajo el estímulo de diferentes citoquinas para ver la respuesta migratoria de las distintas líneas celulares (pág. 60, material y métodos). Primeramente, se constató que las células aisladas de ambientes obesos, tanto en ratón como en humano, presentan una menor capacidad de migración que las células de un ambiente no obeso a través de una membrana porosa en condiciones basales (figura 9). Además se analizó el efecto de diferentes quimio-atrayentes sobre las ASCs. Se utilizaron diferentes citoquinas en la cámara inferior del transwell, SDF-1, TNF- α , MCP-1, HMGB1 e IL8, todos factores descritos como inductores de la migración de distintas líneas de células madre (Galvez et al., 2009, Bernal et al., 2012b). Sorprendentemente, el estímulo de citoquinas induce un aumento en la capacidad de migración en ambos tipos celulares estudiados de ratón y de humano, aunque la citoquina responsable del incremento varía en función del ambiente y del modelo de estudio. Las células cASCs de ratón responden mejor a MCP-1 y la IL8,

mientras que en las oASCs se incrementa mediante la adicción de MCP-1, IL8 y HMGB1 (figura 9A).

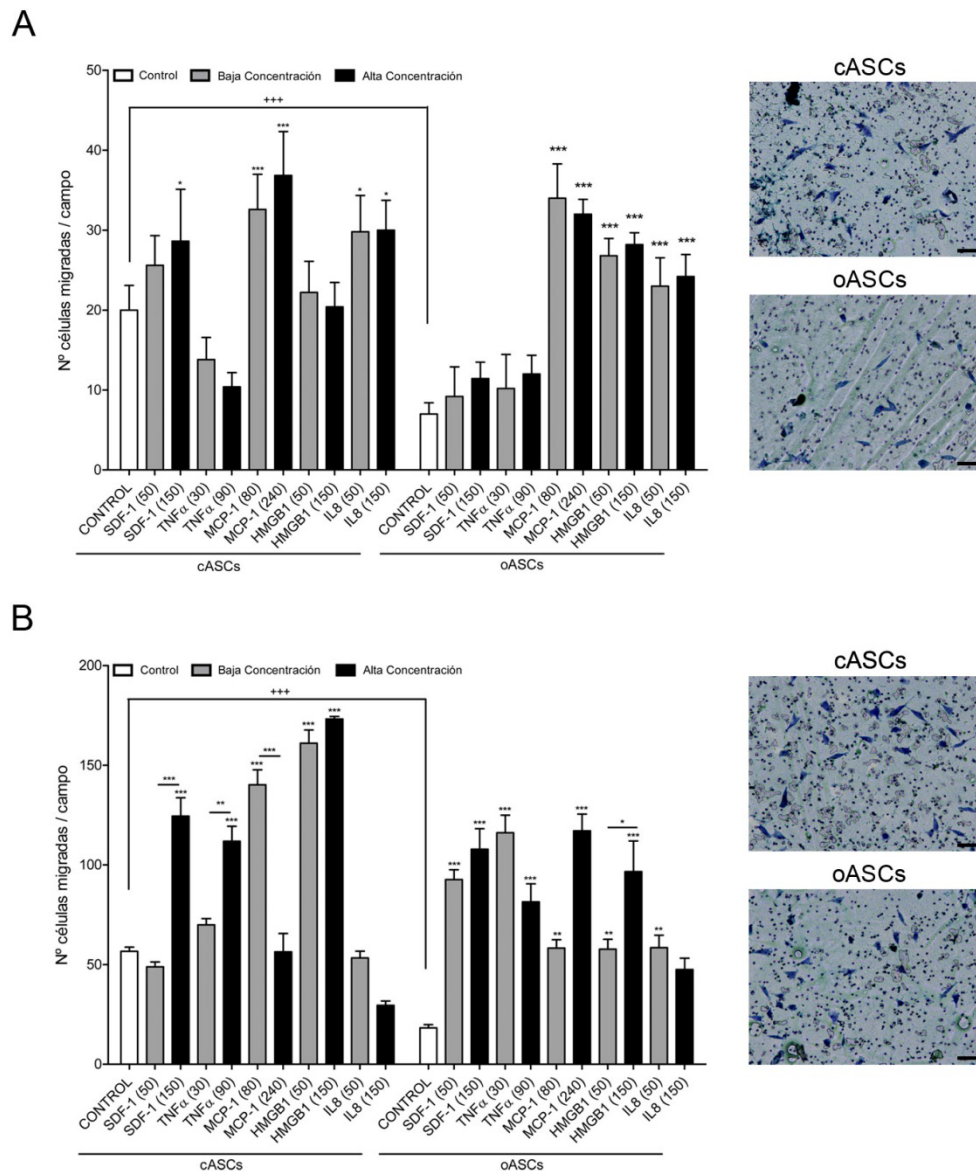


Figura 9. Medida de la migración celular en condiciones basales y tras el tratamiento con diferentes citoquinas. Las ASCs de ratón (A) y de humano (B) fueron inducidas a migrar a durante 24 horas en condiciones basales (Control) en presencia de bajas concentraciones de citoquinas (50ng/ml IL8 y SDF-1; 80ng/ml MCP-1; 30ng/ml TNF- α ; 50ng/ml HMGB1) y en presencia de altas concentraciones de citoquinas (150ng/ml IL8 y SDF-1; 240ng/ml MCP-1; 90ng/ml TNF- α ; 150ng/ml HMGB1). Tras 24 horas las células fueron fijadas y teñidas para realizar el recuento de las células migradas. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; +++ $p < 0,001$ (+ diferencias entre cASCs y oASCs y * diferencias dentro del grupo). Imágenes representativas de la membrana. Barra de escala 10 μ m

En el modelo humano, las células de ambiente no obeso responden mejor al estímulo con MCP-1 y HMGB1, mientras que las obesas aumentan de un modo similar

con SDF-1, TNF- α , MCP-1, HMGB1 o IL8 (figura 9 B). Estos resultados confirman que las células madre de tejido adiposo de individuos obesos presentan una capacidad impedida de migración en condiciones basales en ambos modelos, ratón y humano, pero son capaces de responder a un estímulo quimio-atrayente, incrementándose la capacidad de migración. Finalmente, podemos observar que el aumento de las concentraciones de SDF-1 y MCP-1 produce un incremento en la migración en células cASCs de ratón pero no existen cambios en las células oASCs. En las células de humano el aumento en SDF-1 y TNF- α incrementa la migración en las cASCs mientras que en las oASCs es el aumento de MCP-1 y HMGB1 el que incrementa la migración.

Para determinar si el envejecimiento, debido al mantenimiento en el cultivo, provoca un efecto negativo en la capacidad de migración de las células y si este es diferente en células control y obesas se llevó a cabo un estudio de migración por transwell a distintos pases (figura 10). En las células de ratón, el pase de cultivo produce una disminución de la capacidad de migración tanto en células cASC como en las oASC (figura 10 A). En las células humanas, las cASCs pierden la capacidad de migración con los pases de cultivo, mientras que las oASCs incrementan su capacidad de migración con los pases (figura 10 B).

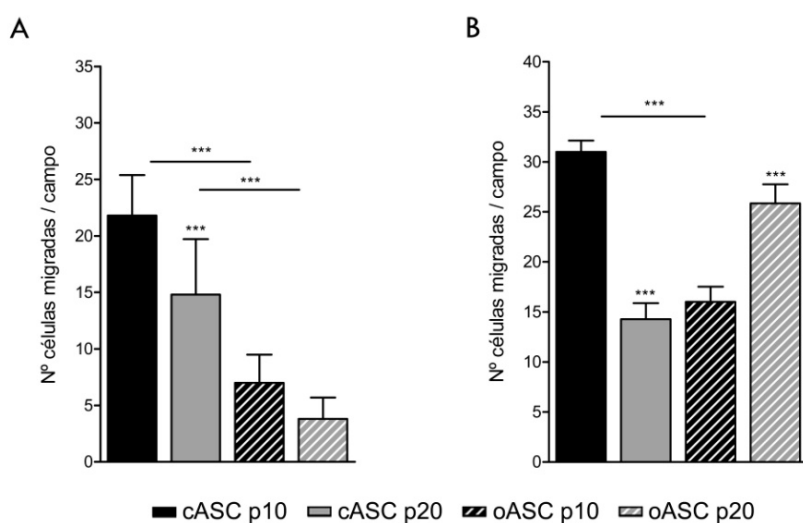


Figura 10. Medida de la migración celular en condiciones basales a diferente pase de cultivo. Las ASCs de ratón (A) y de humano (B) en distintos pases del cultivo, fueron inducidas a migrar a durante 24 horas en condiciones basales. Tras 24 horas las células fueron fijadas y teñidas para realizar el recuento de las células migradas. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos realizados por triplicado. ***p < 0,001.

Para confirmar que el ambiente obeso reduce la capacidad de migración en la población de ASC, se llevó a cabo un ensayo de migración en dos dimensiones para monitorizar el cierre de herida (del inglés “*Wound Healing*”) (pág. 60, material y

métodos). Estos datos muestran una reducción en la capacidad de migración con los pases del cultivo, tanto en las cASCs como en las oASCs de ratón (figura 11 A). Además se observa que en las células de humano el pase reduce la capacidad de migración en cASCs pero no en las oASCs (figura 11 B).

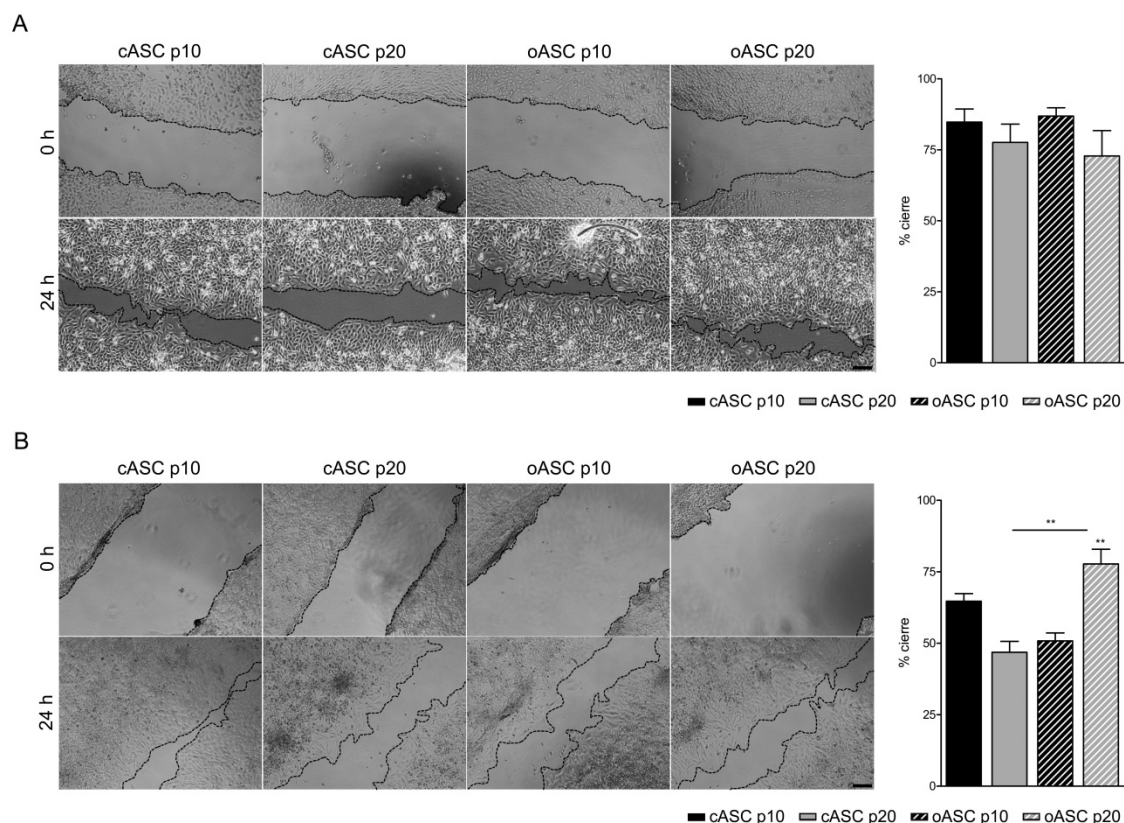


Figura 11. Medida de la migración celular por “Wound healing” en condiciones basales a diferente pase de cultivo. Análisis de la migración por cierre de herida en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a distintos pases del cultivo. Se realizó una herida en el cultivo en confluencia y se monitorizó el cierre de la herida a las 24 horas. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos realizados por triplicado. **p < 0,01. Barra de escala 20 μ m.

Estos datos confirman, que las células madre procedentes de un ambiente obeso, muestran una capacidad de migración disminuida que puede verse incrementada por el tratamiento con citoquinas. Además el envejecimiento del cultivo celular reduce las capacidades en todos los modelos celulares estudiados.

3.2. La obesidad no afecta a la capacidad de invasión de las ASCs.

Las células madre para alcanzar el tejido de interés necesitan la capacidad de migrar, pero también tienen que ser capaces de cruzar la red de proteínas e invadir el tejido. Por ello, se evaluó la capacidad de las ASCs de invadir una matriz mediante ensayos de invasión por transwell con membranas recubiertas con una matriz de

gelatina (pág. 60, material y métodos). Mediante este estudio se constató que la capacidad de atravesar una matriz de proteínas no se ve afectada en las ASCs cuando vienen de un ambiente obeso (figura 12). En ambos modelos, ratón y humano, no existen diferencias significativas en la capacidad de invasión en condiciones basales entre las cASCs y las oASCs.

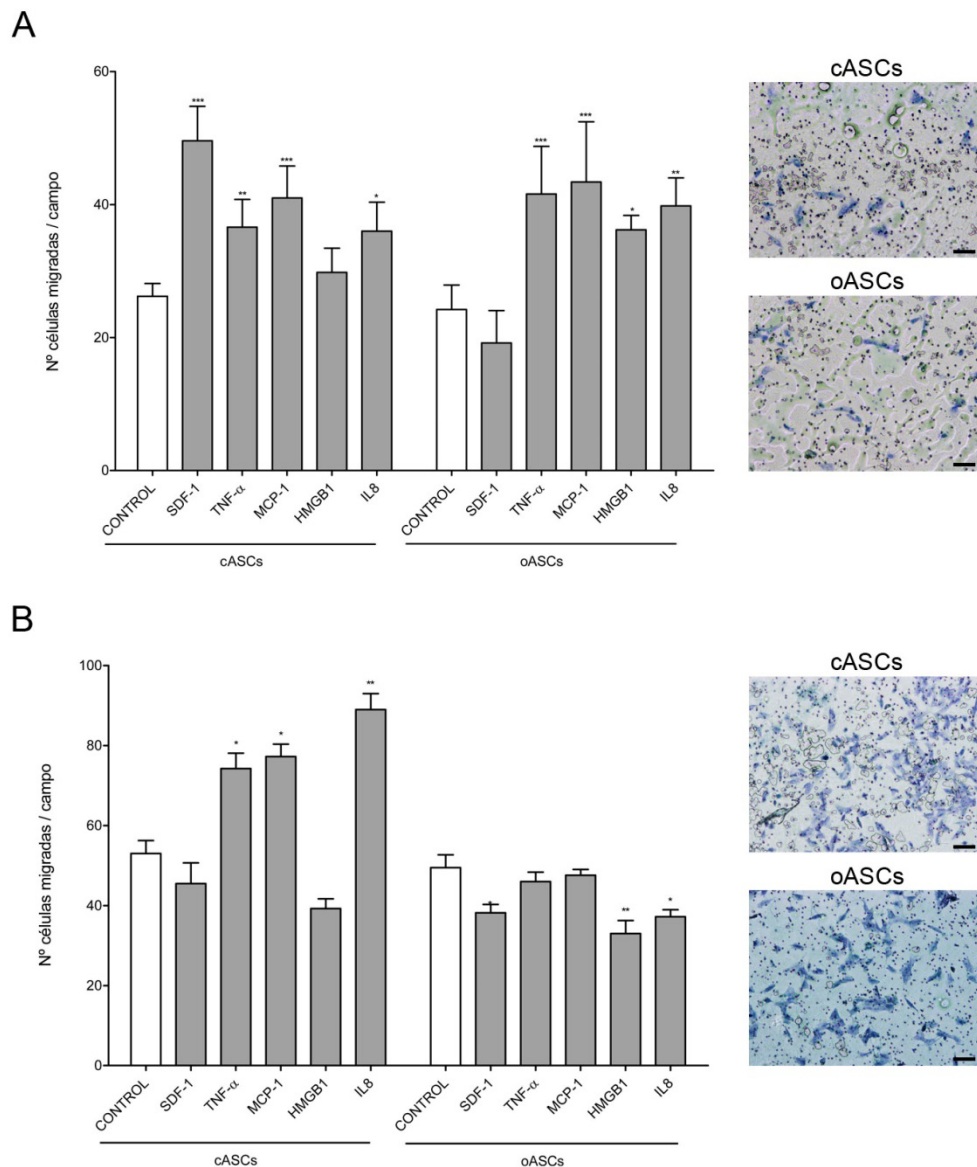


Figura 12. Medida de la invasión celular en condiciones basales y con el estímulo de citoquinas. Análisis de la invasión en las ASCs de ratón (A) y de humano (B). La invasión se realizó en membranas transwell recubiertas de gelatina 1% durante 24 horas en condiciones basales (Control) y en presencia de citoquinas (50ng/ml IL8 y SDF-1; 80ng/ml MCP-1; 30ng/ml TNF-α; 50ng/ml HMGB1). Tras 24 horas las células fueron fijadas y teñidas para realizar el recuento de las células migradas. Los resultados están representados como media ± S.E.M. de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Imágenes representativas de las membranas. Barra de escala 10 μm .

El análisis de la trans migración de las ASCs en respuesta a diferentes citoquinas muestra una respuesta similar en ambos tipos celulares en el modelo de ratón (figura 12 A). Las células obtenidas de ratón responden a las distintas citoquinas incrementando su capacidad de trans migración, aunque las obesas no son capaces de responder a un estímulo con SDF-1. Por el contrario, en el modelo humano la respuesta a las citoquinas es diferente en cASCs y oASCs (figura 12 B). Las cASCs aumentan su capacidad de invasión cuando se estimulan con TNF- α , MCP-1 o IL8, pero no responden al tratamiento con SDF-1 y HMGB1. Sin embargo las oASCs no responden al tratamiento con ninguna de las citoquinas y en algunos casos se ve disminuida su capacidad de invasión.

Posteriormente, se analizó si la capacidad de invasión se ve afectada por el pase de cultivo al igual que la de migración (figura 13). Observamos nuevamente que no hay diferencias significativas entre cASCs y oASCs. Sin embargo el envejecimiento del cultivo por pases sí afecta a la capacidad de invasión de las ASCs. Con el pase de cultivo, las células pierden la capacidad de atravesar una matriz de proteínas, tanto en el modelo de ratón (figura 13 A) como en el humano (figura 13 B).

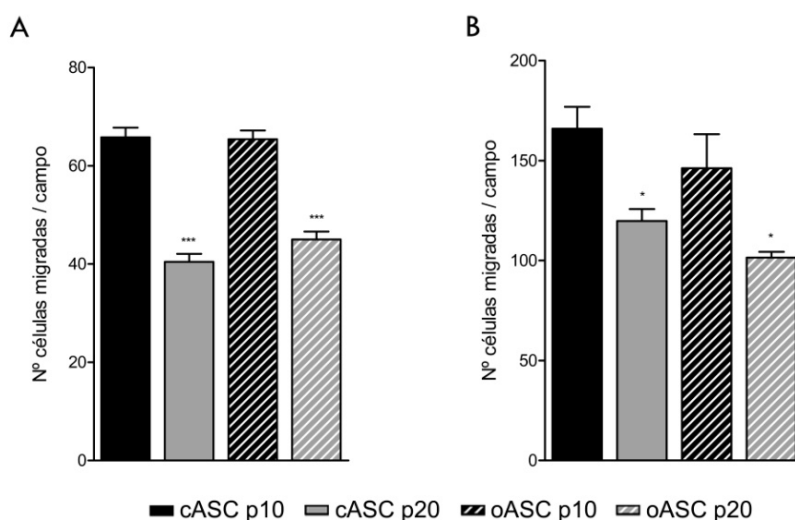


Figura 13. Medida de la invasión celular en condiciones basales y con el estímulo de citoquinas. Análisis de la invasión en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) en distintos pases del cultivo. La invasión se realizó en membranas transwell recubiertas de gelatina 1% durante 24 horas en condiciones basales. Tras 24 horas las células fueron fijadas y teñidas para realizar el recuento de las células migradas. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

La capacidad de invasión por lo tanto, no se ve afectada por el ambiente obeso y las células responden positivamente al tratamiento con citoquinas. Al igual que la

capacidad de migración, el envejecimiento por el pase de cultivo, produce una pérdida en la capacidad de invadir una matriz proteica en todas las ASCs.

3.3. La obesidad disminuye la capacidad de angiogénesis en las ASCs.

Se ha descrito que las ASCs pueden participar en la regeneración a través de procesos de angiogénesis (Efimenko et al., 2011, Konno et al., 2010). Para comprobar la capacidad de formar estructuras capilares, realizamos un ensayo de angiogénesis *in vitro* (figura 14). Para ello utilizamos una matriz de proteínas (“*matrigel*”) para crecer las células y promover la formación de estructuras capilares debido a la mezcla de factores pro-angiogénicos presentes en la matriz (pág. 60, material y métodos). Los resultados muestran que la capacidad de angiogénesis de las ASCs se ve afectada en las células de individuos obesos (figura 14).

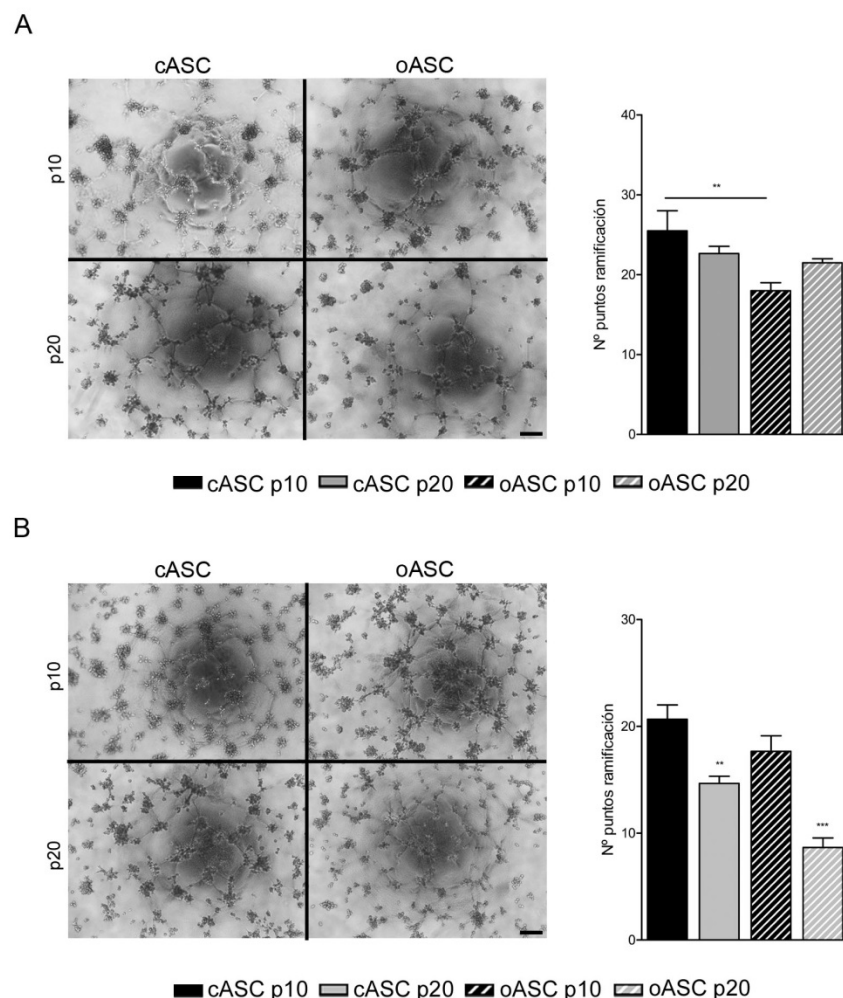


Figura 14. Medida de la angiogénesis celular a distintos pases de cultivo. Análisis de la capacidad de formación de capilares en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) en distintos pases del cultivo. Las células fueron sembradas sobre matrices de proteínas (*matrigel*). Tras 24h se tomaron imágenes de los pocillos. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de seis experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra de escala 20 μ m.

En las células aisladas de ratón la obesidad produce una disminución de la capacidad angiogénica respecto a las aisladas de ratones no obesos (figura 14 B). Además el pase de cultivo afecta a la capacidad de formar túbulos en las cASC pero no en las oASC. Por el contrario en las ASC aisladas de humanos, la obesidad no afecta a la capacidad de formar capilares, pero si se reduce la capacidad con el pase de cultivo tanto en cASCs, como en oASCs (figura 14 B).

Estos resultados muestran que las células de ambiente obesos presentan también menor capacidad angiogénica respecto a células control, por lo que se confirma que la obesidad afecta negativamente a las propiedades regenerativas de las células madre adultas. Asimismo se constata que el envejecimiento del cultivo disminuye las capacidades estudiadas; migración, invasión y angiogénesis.

4. Estudio del efecto de la obesidad sobre la viabilidad de las ASC.

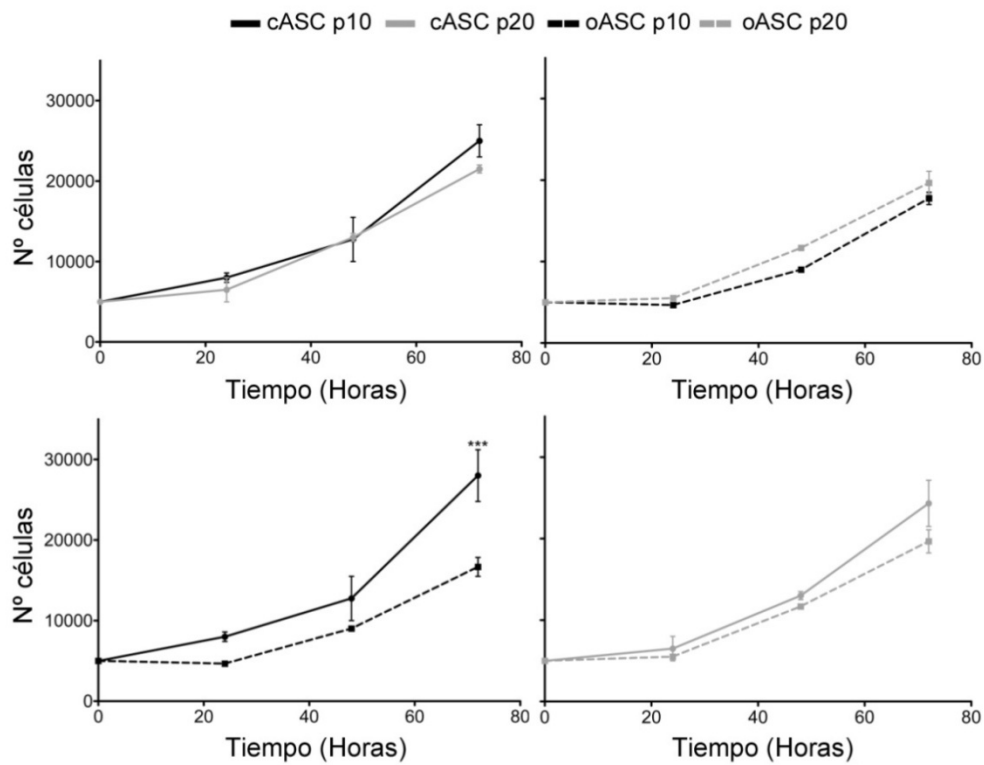
Teniendo en cuenta el efecto negativo que tiene el ambiente obeso sobre las principales capacidades de regeneración (migración, invasión y angiogénesis) se procedió a evaluar la viabilidad celular de esta población *in vitro*.

4.1. La obesidad provoca una disminución en la proliferación de las ASCs en el cultivo celular.

Se procedió a evaluar la tasa de proliferación celular que presentan las ASCs en condiciones estándar de cultivo. Se analizó la proliferación celular mediante curvas de crecimiento para establecer la cinética de proliferación de las distintas poblaciones celulares estudiadas (figura 15). En primer lugar se constató que el pase de cultivo promueve una disminución en la tasa de proliferación celular, tanto en la población de cASC como en oASC de ratón y de humano. Estas diferencias se manifiestan de forma significativa solo en el modelo humano (figura 15 B). Estos datos indican que se produce una pérdida en la proliferación celular debido al envejecimiento por pases en el cultivo de las ASCs.

Cuando se evalúan las diferencias en proliferación entre células de individuos no obesos y las de obesos, se constata que existe un efecto negativo y que disminuye la proliferación *in vitro* de las oASC respecto a las cASC, independientemente del pase en el que se encuentre, aunque las diferencias son significativas en pases más tempranos (p10).

A



B

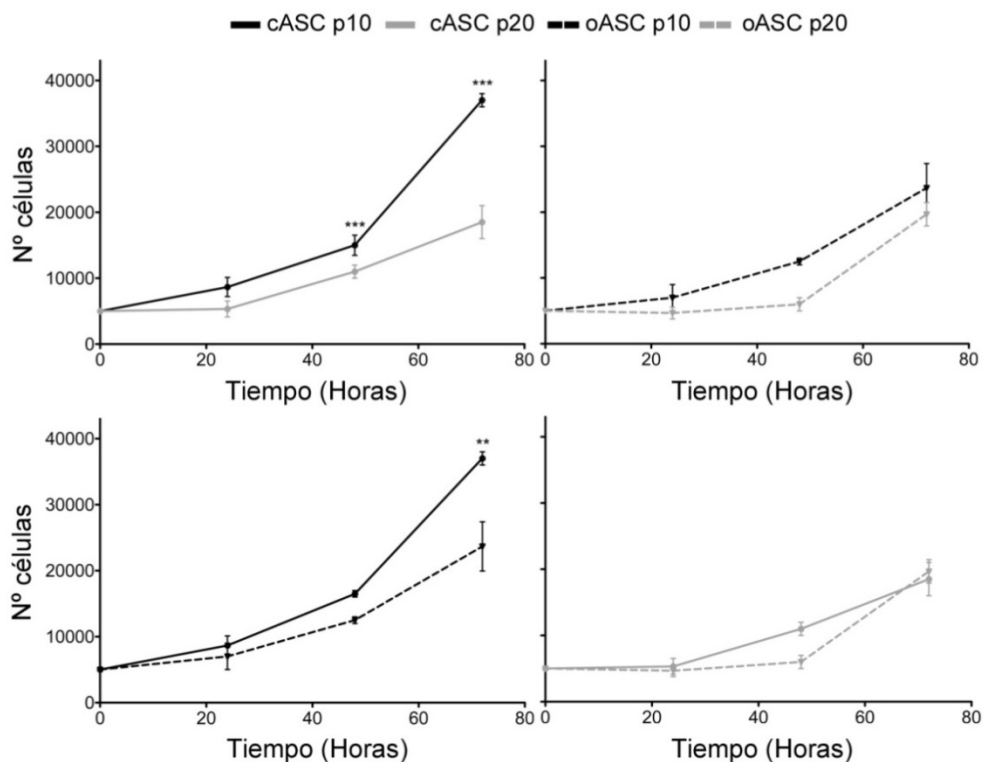


Figura 15. Medida de la proliferación celular en condiciones basales a diferente pase de cultivo.

Curvas de crecimiento de las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos realizados por triplicado. ** $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

Los resultados demuestran por lo tanto que el envejecimiento del cultivo induce una disminución en la capacidad proliferativa y que solo en el modelo humano la obesidad reduce la proliferación celular respecto al control.

4.2. Las ASCs de ambientes obesos presentan mayor tamaño celular.

Uno de los principales cambios morfológicos que se dan en los cultivos celulares es el cambio en el tamaño celular (Wagner et al., 2008). Se procedió a analizar el tamaño que presentan las células *in vitro* en base a los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) mediante citometría de flujo. Tras el análisis se puede observar que las oASC presentan un mayor tamaño celular que las cASC en el modelo de ratón (figura 16 A) y que estas diferencias no son significativas en las células de humano (figura 16 B). Además se constata que el pase de cultivo promueve un incremento del tamaño celular en ambos tipos celulares, cASC y oASC en el modelo humano.

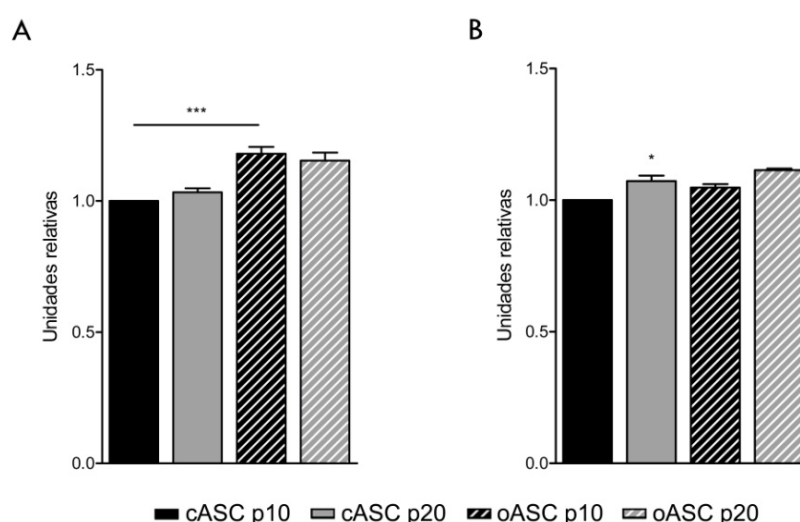


Figura 16. Medida del tamaño celular a diferente pase de cultivo. Tamaño celular de las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.3. Incremento de la apoptosis en durante el cultivo de las ASCs.

Las curvas de crecimiento y el análisis del tamaño celular muestran cambios en la capacidad de proliferación y en la morfología de las ASC de individuos obesos. De acuerdo a estos resultados se procedió a analizar la apoptosis existente en el cultivo celular mediante el kit “Violet Ratiometric Membrane Asymmetry Cell Apoptosis” (pág. 109, material y métodos). Se constató que las células provenientes de ambientes obesos, tienen mayores niveles de apoptosis temprana y tardía en el cultivo que las

cASC, en ambos modelos ratón (figura 17 A) y humano (figura 17 B). Además, se observó que el pase de cultivo no incrementa la apoptosis, por lo que el efecto del envejecimiento por pases no está directamente unido a procesos de apoptosis *in vitro*.

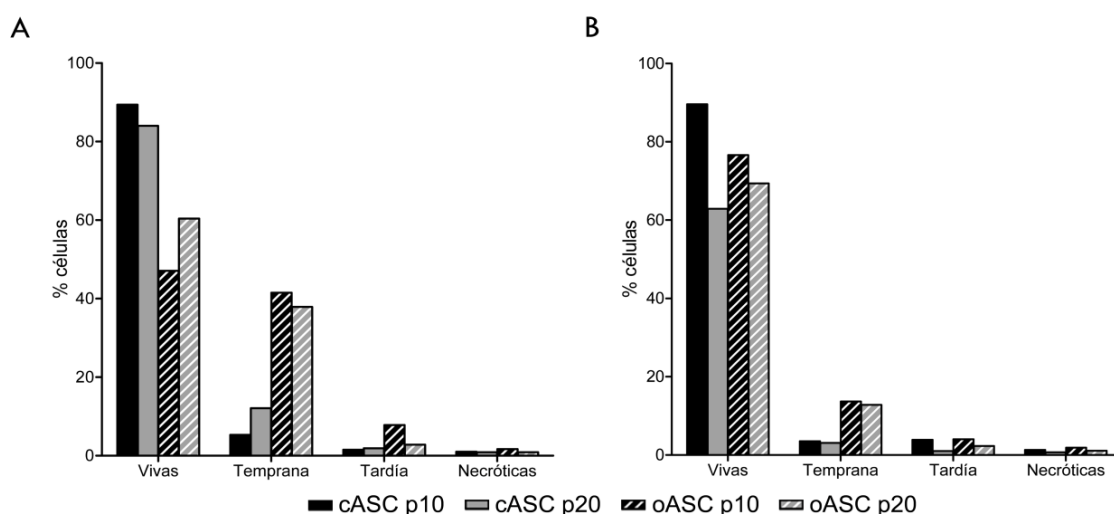


Figura 17. Niveles de muerte celular en el cultivo de las ASCs. Análisis de la apoptosis *in vitro* de las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Ensayo representativo de cuatro experimentos independientes.

Conjuntamente, los resultados sugieren que las ASCs derivadas de individuos con obesidad presentan una menor tasa de proliferación *in vitro* que las de no obesos. Además presentan un aumento en la apoptosis celular del cultivo y un incremento en el tamaño celular disminuyendo por lo tanto la viabilidad de las células obesas *in vitro*.

5. Efecto de la obesidad sobre el metabolismo celular de las ASCs.

El metabolismo celular es importante para la producción de energía y el mantenimiento de las propiedades de auto-renovación y multipotencia de las células madre. Con los cambios observados en la funcionalidad y viabilidad de las ASCs *in vitro* provenientes de ambientes obesos, se procedió a evaluar el estado metabólico de las distintas poblaciones celulares durante el cultivo celular.

5.1. Las ASCs de individuos obesos presentan un mayor contenido mitocondrial.

Recientemente se ha observado que la mitocondria está íntimamente relacionada con el mantenimiento celular (Xu et al., 2013). Para comprobar si las ASCs presentan cambios en la cantidad de mitocondrias, se analizó mediante citometría de flujo los niveles de mitocondria presentes en las células y se confirmó su distribución por el citoplasma mediante inmunofluorescencia. Los resultados muestran

que las oASCs presentan una mayor cantidad de mitocondrias respecto a las cASCs tanto en el modelo de ratón (figura 18 A) como en el humano (figura 18 B), siendo este significativo únicamente en las células de ratón. Cuando se analizan las posibles diferencias por el envejecimiento del cultivo, se observa que a pases tardíos (p20) las cASCs de ambos modelos, ratón y humano, presentan un aumento correlativo en la cantidad de mitocondrias, sin embargo en las oASCs el pase del cultivo disminuye la cantidad de mitocondrias.

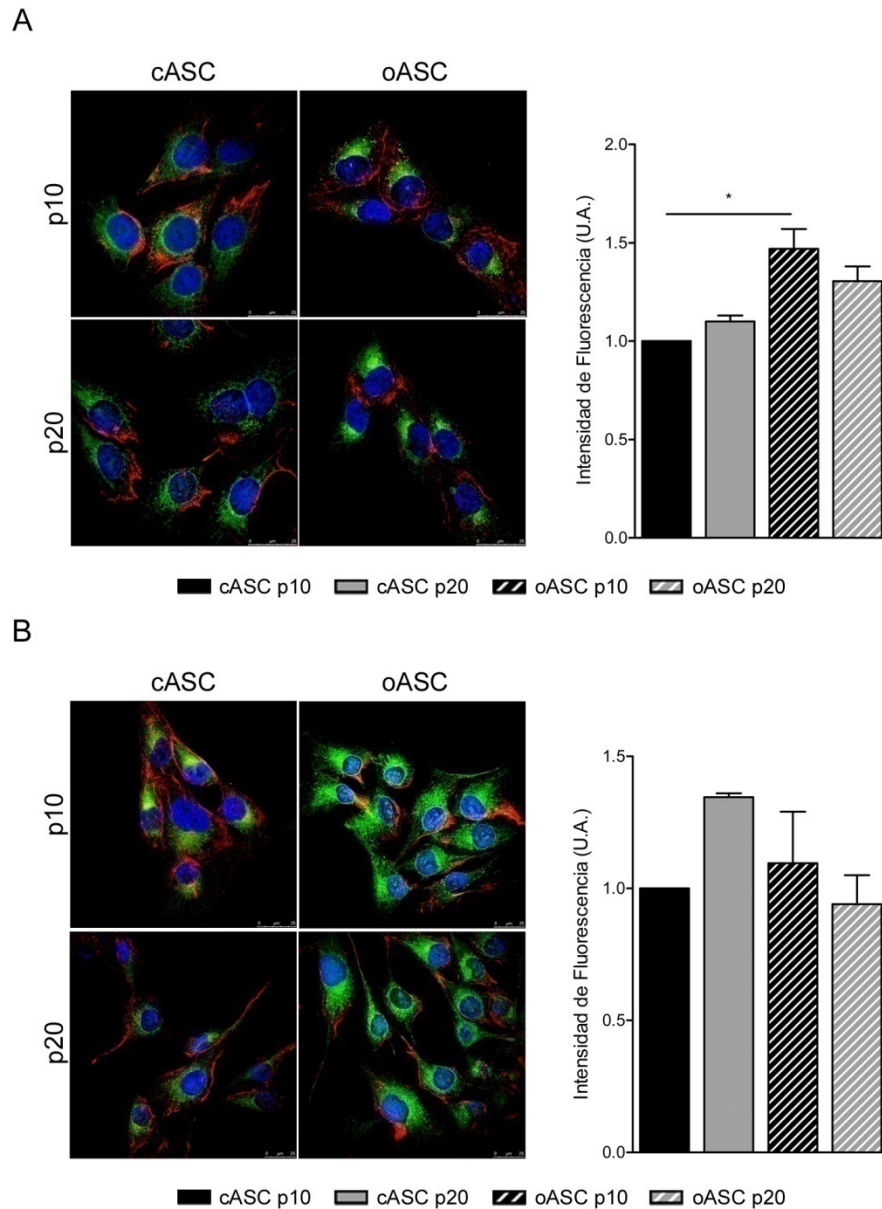


Figura 18. Estudio de la cantidad de mitocondrias en las ASCs. Análisis mitocondrial en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Imágenes representativas de las células marcadas con la sonda Mitotracker Green (verde), con un anticuerpo específico para caveolina-1 (verde) y núcleos contrateñidos con DAPI (azul). Barra de escala, 25µm. Cuantificación de la cantidad de mitocondrias por citometría de flujo mediante tinción fluorescente con la sonda Mitotracker Green. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. *p < 0,05.

5.2. Las ASCs de individuos obesos producen mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno en el cultivo celular.

Las mitocondrias son una de las principales fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células. Para comprobar si la proliferación celular de las ASC puede verse afectada por la formación de ROS en cultivo, se analizó mediante citometría de flujo los niveles presentes en el citoplasma celular mediante un indicador relativo fluorescente, mitosox. Los resultados muestran que las ASCs procedentes de individuos obesos presentan un aumento en la acumulación de ROS respecto a las cASCs tanto en el modelo de ratón como en el humano (figura 19). Sorprendentemente, a lo largo de los pases se produce un aumento en las cASC de ratón (figura 19 A) y se mantienen los niveles en el humano (figura 19 B). Sin embargo en las oASC a pase tardío (p20) se produce una disminución en los niveles tanto en las de ratón como en las de humano. Estos datos indican que el cultivo de ASCs provenientes de individuos no obesos, tienen un menor grado de producción de ROS y que por lo tanto son menos susceptibles de sufrir los potenciales efectos deletéreos causados por estas especies. Por el contrario los niveles aumentados de ROS en las oASC pueden ser los causantes de las pérdidas funcionales y de viabilidad que presentan durante el cultivo celular.

Conjuntamente se observa que las células obesas presentan un incremento en la cantidad de mitocondrias que podría estar asociado al aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno que producen estas células en el cultivo *in vitro*.

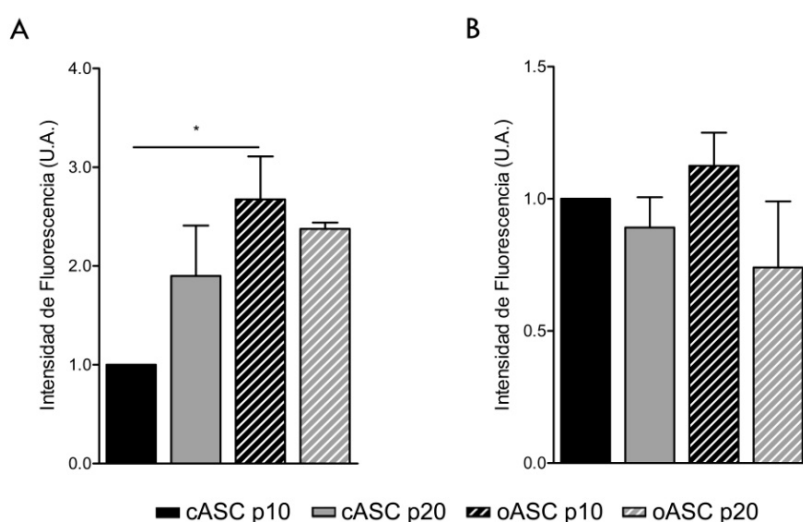


Figura 19. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno en cultivo. Producción de ROS en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Cuantificación por citometría de flujo mediante el uso de la sonda Mitosox Red. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. * <0.02 .

5.3. Efecto de la obesidad sobre el metabolismo de las ASC.

Se evaluó el impacto de la obesidad sobre el metabolismo celular de las ASC durante el cultivo. Para ello, se monitorizó la tasa de consumo de oxígeno (OCR, del inglés “*Oxygen Consumption Rate*”) y la tasa de acidificación del medio (ECAR, del inglés “*Extra Cellular Acidification Rate*”) (medida directa de la secreción de ácido láctico al medio y por tanto actividad glucolítica celular) utilizando para ello la tecnología “*Seahorse*” (pág. 63, material y métodos).

5.3.1. Metabolismo glucolítico.

Mediante el uso de glucosa como fuente de carbono se analizó el metabolismo glucolítico de las células, observándose una tendencia de las cASC a mantener un mayor grado de consumo basal de oxígeno tanto en el modelo de ratón (figura 20 A) como en el humano (figura 20 B). De forma similar, la capacidad máxima de respiración mitocondrial tras la adición del FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxihidrazona) en las cASC es mayor que en las oASC en ambos modelos. En el caso de la actividad glucolítica por acidificación del medio, se observa que las cASC mantienen un mayor grado de acidificación del medio y por tanto un mayor flujo glucolítico que las oASC, tanto en ratón como en humano. Cuando se analizan las diferencias producidas por el envejecimiento del cultivo, se observa que los pases incrementan el consumo de oxígeno y el grado de acidificación del medio manteniendo las diferencias entre cASC y oASC en el modelo de ratón (figura 20 A). Sin embargo en el modelo humano se observa que en el pase tardío (p20) las oASC incrementan el consumo de oxígeno y la acidificación por encima de los niveles de las cASC a pase 20.

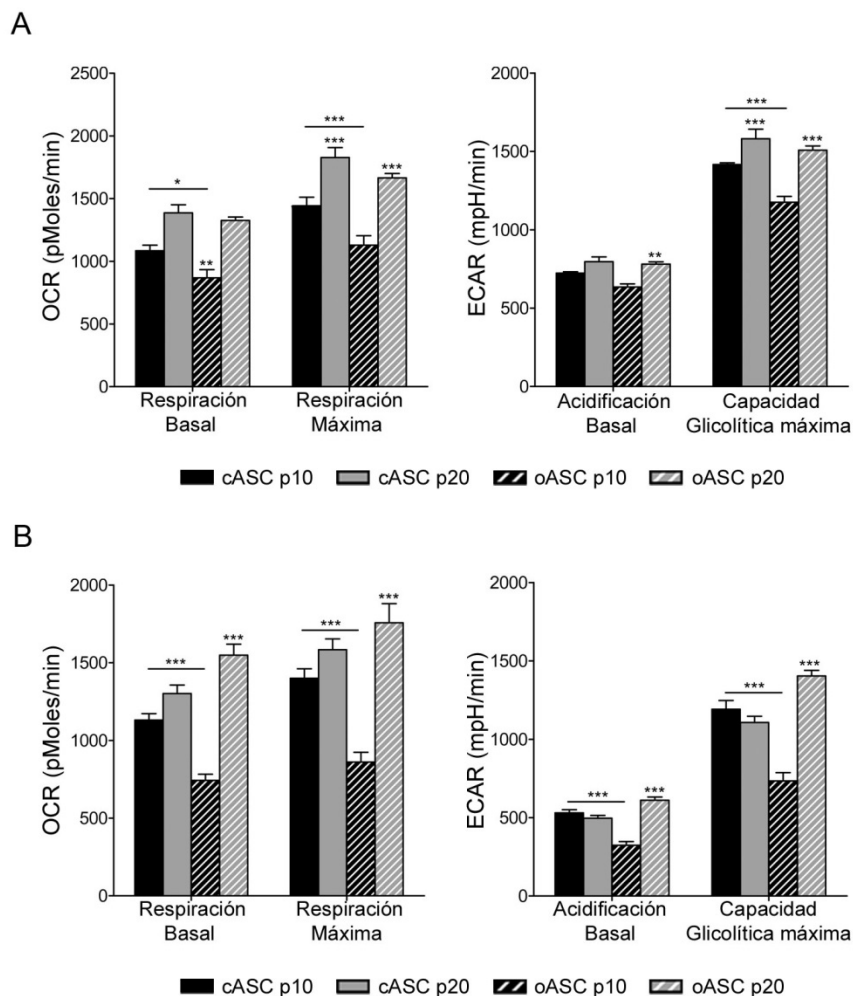


Figura 20. Consumo de oxígeno y acidificación del medio de las ASC en la glucólisis. Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación del medio (ECAR) en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Se representan los niveles de respiración basal y máxima a través del consumo de oxígeno y los niveles de acidificación basal y la capacidad glucolítica máxima a través de la acidificación del medio. Consumo de oxígeno expresado en (pMol/min) y tasa de acidificación del medio expresada en (mpH/min). Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3.2. Metabolismo de los ácidos grasos.

Para evaluar el metabolismo de los ácidos grasos (β -Oxidación), se utilizaron ácidos grasos (carnitina y palmitato) como fuente de carbono. Los resultados muestran que el consumo de oxígeno es mayor en las oASC que en las cASC en ambos modelos, ratón y humano (figura 21). De la misma forma, la capacidad máxima de respiración mitocondrial es mayor en las oASC que en las cASC. Cuando se analizó el grado de acidificación del medio tras el consumo de ácidos grasos, se observa que las oASC mantienen un mayor grado de acidificación que las cASC tanto en ratón como en humano. El análisis de las diferencias tras los pases del cultivo muestra como las

células de ratón no presentan variaciones en los valores con los pases cuando las células provienen de ambientes no obesos y una pérdida de capacidad de uso de ácidos grasos en los pases de las oASC (figura 21 A). Sin embargo las células humanas presentan una disminución en el consumo de oxígeno y en la acidificación en ambos tipos celulares, cASC y oASC, cuando se produce el envejecimiento del cultivo celular (figura 21 B).

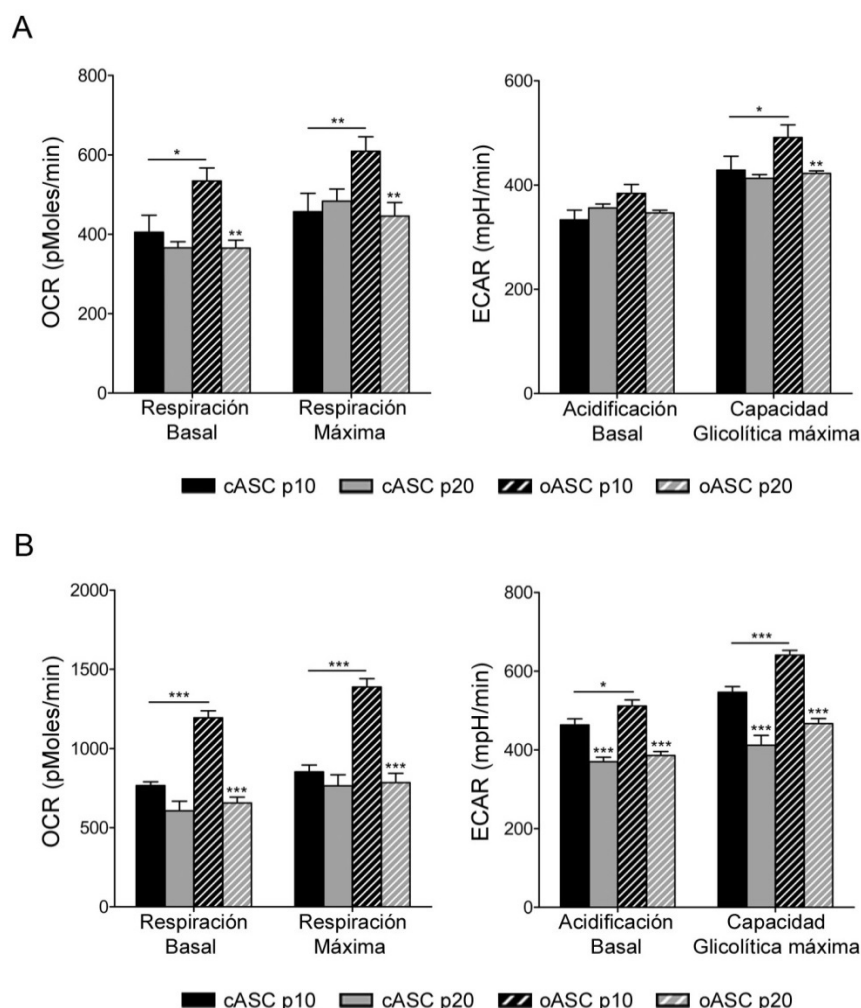


Figura 21. Consumo de oxígeno y acidificación de las ASC en la β -Oxidación. Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación del medio (ECAR) en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Se representan los niveles de respiración basal y máxima a través del consumo de oxígeno y los niveles de acidificación basal y la capacidad glucolítica máxima a través de la acidificación del medio. Consumo de oxígeno expresado en (pMol/min) y tasa de acidificación del medio expresada en (mpH/min). Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Estos resultados, indican por lo tanto que aunque las oASCs contienen un mayor número de mitocondrias, estas no son utilizadas eficientemente en procesos glucolíticos, ya que el consumo de oxígeno es inferior que en las cASCs. Sin embargo, cuando las células son forzadas a llevar a cabo la β -oxidación, las oASCs utilizan

mejor esta fuente de carbono que las cASCs presentando niveles de consumo de oxígeno superiores.

5.4. Cambios metabólicos en las ASC.

Se ha visto que la obesidad produce un cambio en el metabolismo energético, y que este proceso es el encargado de procesos fundamentales en las células. Por ello se han analizado los niveles de diferentes metabolitos en el interior y en el exterior celular (pág. 64, material y métodos). El análisis del contenido intracelular muestra cambios en el interior de las oASC, tanto en ratón como en humano (tabla 2). Existe una reducción del 35% en la cantidad de leucotrienos (citoquina proinflamatoria) (Osborn and Olefsky, 2012), en las oASC de ratón y del 65% en las oASC de humano. Además se observa una reducción del 29% en la cantidad intracelular de creatina (molécula antioxidante) (Meyer et al., 2006) en las oASC de ratón y del 76% en las oASC de humano. Estos resultados muestran que la producción de citoquinas en las oASCs está alterada en las células que se encuentran en individuos con obesidad.

	Nombre	TR (min)	Masa	p-valor	Ob vs Ctrl [%]
Ratón	Leucotrieno A4	4,11	340,2016	2,51E-03	-65
	Creatina	14,2	340,2016	1,58E-02	-71
Humano	Leucotrieno A4	4,11	131,0696	-	-35
	Creatina	0,27	131,0696	2,09E-02	-24

Tabla 2. Componentes significativamente alterados en las ASC de obeso (Ob) respecto de las ASC de individuos no obesos (Ctrl). TR; Tiempo de retención.

Cuando se analiza el contenido de los metabolitos en el exterior celular, el medio de cultivo (tabla 3), se observa un incremento en la cantidad de glucosa y de ácido glutámico en el exterior de las oASC, tanto en el humano como en el ratón, sugiriendo una alteración en la captación de glucosa.

El análisis metabólico de las ASCs sugiere que las oASCs presentan una disminución en la captación de glucosa y una protección proinflamatoria y antioxidante disminuida, por lo que existe una alteración tanto metabólica como secretora de las células residentes en ambientes obesos.

	Nombre	TR (min)	Masa	p-valor	Ob vs Ctrl [%]
Ratón	Ácido mirístico	21,97	343	-	-100
	Glucósido de acilo graso	8,11	604,4841	1,58E-02	31
	Bismonostearin	24,95	399	-	-100
	Fructosa/Glucosa	0,24	202.0455	1,07E-03	30
	Fenilalanina	0,26	165,079	1,58E-02	38
	Ácido glutámico	0,41	129,0428	8,16E-03	31
Humano	Ácido mirístico	21,97	343	3,69E-02	-42
	Glucósido de acilo graso	8,11	604,4841	1,58E-02	100
	Bismonostearin	24,95	399	3,69E-02	-41
	Fructosa/Glucosa	17,08	103	3,69E-02	89
	Fenilalanina	14,43	218	1,58E-02	68
	Ácido glutámico	13,15	156	2,30E-02	141

Tabla 3. Componentes significativamente alterados en el medio de cultivo de las ASC de obeso (Ob) respecto de las ASC de individuos no obesos (Ctrl). TR; Tiempo de Retención.

5.5. Respuesta alterada en condiciones de hipoxia en las ASC de obesos.

La obesidad está asociada a un ambiente de hipoxia en el nicho de las células del tejido adiposo, causando el desarrollo de una resistencia a la insulina en los adipocitos (Jiang et al., 2011). Para evaluar el papel de Hif1 α , principal mediador de la respuesta en procesos de hipoxia, se analizaron los niveles de expresión y la cantidad de proteína en las ASCs. Los resultados muestran que los niveles de expresión de Hif1 α son significativamente menores en las oASC, disminuyendo la expresión hasta un 40% en humanos. Además los niveles también disminuyen con los pases del cultivo en las células humanas (figura 22 B) pero no en las procedentes del ratón (figura 22 A). La cuantificación de los niveles de proteína en los extractos de estas células, confirman que la cantidad de proteína Hif1 α es menor en oASC tanto en el modelo humano como en el de ratón, cerca de un 30% y un 20% menos respectivamente.

Estos resultados muestran que las ASCs que se han visto sometidas a un ambiente obeso presentan una respuesta alterada a las condiciones de hipoxia del tejido adiposo.

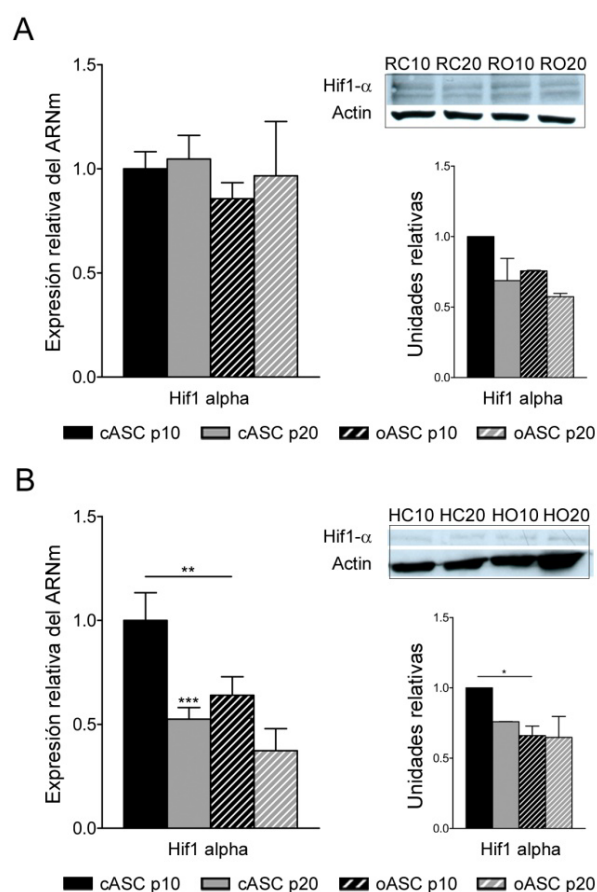


Figura 22. Análisis de Hif1α en las ASC. Cuantificación de la expresión relativa de Hif1α mediante RT-PCR a tiempo real de las ASC de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Inmunodetección de la proteína Hif1α en extractos celulares totales de las ASC. Los resultados muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. Estabilidad cromosómica de las ASC en cultivo.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo induce daño en el ADN (Chen et al., 1995). Para determinar si el ambiente obeso provoca una mayor genotoxicidad celular en las poblaciones de ASC, se analizaron diferentes parámetros asociados a la estabilidad cromosómica como la longitud telomérica y la expresión de ciertos marcadores.

6.1. La obesidad aumenta el acortamiento telomérico de las ASCs in vitro.

Prácticamente ninguna célula madre adulta expresa los niveles suficientes de telomerasa para el mantenimiento de los cromosomas in vitro de forma indefinida, lo cual induce un acortamiento progresivo telomérico con las divisiones celulares de las

células durante el cultivo in vitro (Harley et al., 1990). Se procedió a evaluar la longitud telomérica media de las células obesas y no obesas y a diferente pase de cultivo. Para ello se hibridaron núcleos celulares en interfase con sondas PNA (*PNA, Peptide Nucleic Acid*) específicas para regiones teloméricas y se cuantificó la longitud mediante la técnica de cuantificación de fluorescencia por hibridación In situ Q-FISH (*Q-FISH, Quantitative Fluorescent in situ hybridization*) (pág. 65, material y métodos). El análisis mostró que las células oASC presentan un acortamiento telomérico acentuado con respecto a las cASC (figura 23). Además durante el cultivo in vitro las células cASC presentan acortamiento telomérico en el modelo de ratón (figura 23 A) pero no en el humano (figura 23 B), sin embargo, las células oASC no presentan pérdidas en los telómeros con los pases del cultivo en ambos modelos.

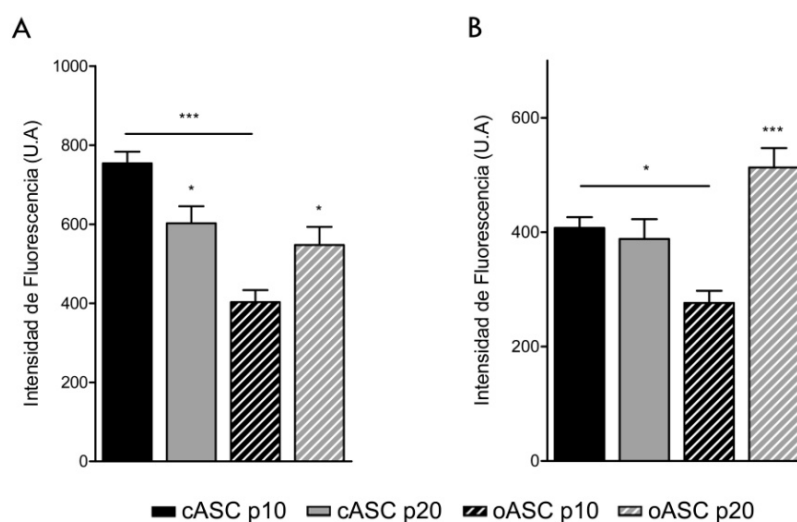


Figura 23. Análisis de la longitud media telomérica de las ASC en interfase. Cuantificación de la longitud telomérica mediante Q-FISH en núcleos de células en interfase de ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. La intensidad de fluorescencia representa una estimación indirecta de la longitud telomérica. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

La telomerasa es la responsable del mantenimiento de la longitud telomérica durante el mecanismo de replicación de las células (Blackburn, 1991). Tras observar el acortamiento telomérico en las oASC, se decidió analizar la actividad telomerasa presente en las líneas ASC (pág. 67, material y métodos). Los datos de la cuantificación de la actividad telomerasa presente en las distintas líneas demuestran que esta actividad en el modelo de ratón se ve afectada en las oASC pero no por el pase de cultivo en cASC u oASC (figura 24 A). En las células humanas la actividad no está afectada en las oASC pero si disminuye con el pase del cultivo en ambos casos, cASC y oASC (figura 24 B).

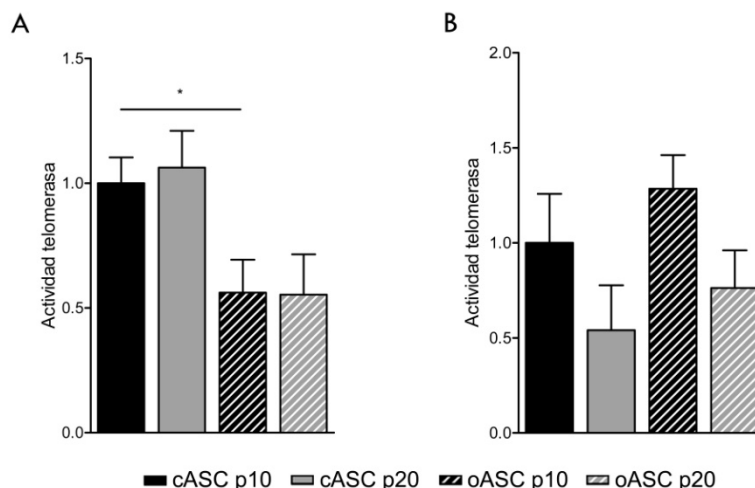


Figura 24. Actividad telomerasa presente en las ASCs. Cuantificación de la actividad telomerasa mediante ensayo TRAP en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. * $p < 0,02$.

Para comprobar si el efecto de la obesidad no es solo en los extremos cromosómicos, se analizó si se están activando las vías de prevención y respuesta al daño en el ADN mediante la acumulación de la proteína p53 (proteína supresora de tumores) y la proteína p21 (*CDKN1A*, Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A”), ambas partícipes de la respuesta DDR. Se cuantifico la expresión de ambas proteínas, observándose un aumento en la expresión de las proteínas p53 y p21 en las líneas oASC de ratón (figura 25 A) pero solo un aumento de p21 en las oASC de humano (figura 25 B). Además el pase de cultivo no incrementa los niveles de expresión en las ASC de ratón pero si lo hace en las células humanas para p21, aunque no ocurre cuando las células provienen de ambientes obesos.

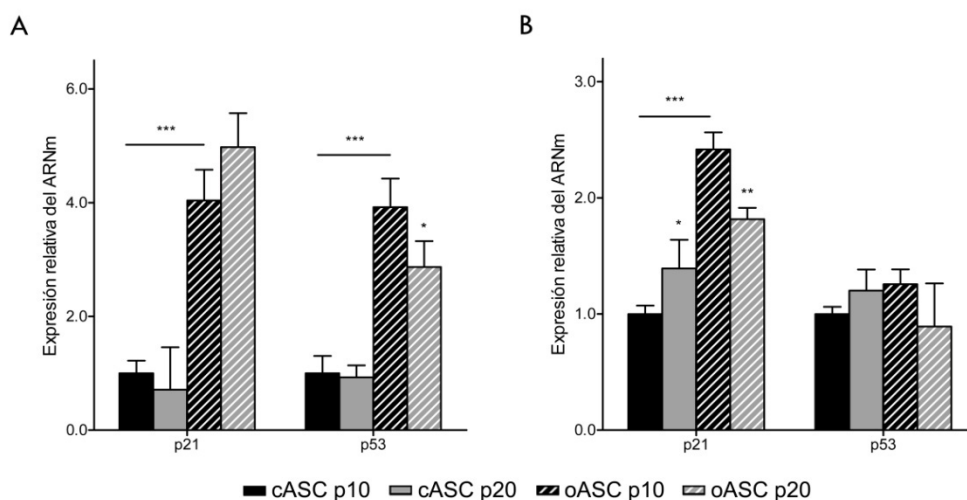


Figura 25. Mecanismo de DDR en las ASC. Expresión de p21 y p53 en las ASCs de ratón (A) y de humano (B) y a diferente pase de cultivo. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El análisis de la estabilidad cromosómica revela por lo tanto, que el ambiente obeso afecta negativamente al ADN promoviendo un acortamiento telomérico en las células. Además se observa un aumento en los niveles de las proteínas implicadas en la DDR que desencadenan el aumento en la apoptosis celular.

7. Pérdida de la capacidad de auto-renovación de las ASCs de individuos obesos.

Estudios previos demuestran que la familia de las proteínas TET juega un papel importante en el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación (del inglés *self-renewal*) y multipotencia de las células madre (Mohr et al., 2011). Para determinar si la obesidad produce una alteración en la capacidad de auto-renovación de las ASC se analizó el estado de hidroximetilación del ADN y la expresión de varios genes de pluripotencia descritos (Pierantozzi et al., 2011).

7.1. Hidroximetilación del ADN.

La metilación e hidroximetilación del ADN es un proceso que determina la regulación de la expresión de los genes en esa zona, de forma que en términos generales, la metilación de una secuencia provoca la represión de esos genes y no serán transcritos. Para determinar si la obesidad causa alteraciones en la regulación de la expresión de los genes, se cuantificó si existían diferencias en la expresión de las proteínas TET que contiene tres variantes; TET1, TET2 y TET3. Los resultados muestran una disminución significativa en la expresión de TET1 y TET2 en las oASC, tanto en el modelo de ratón (figura 26 A) como en el humano (figura 26 B). Sin embargo en el modelo de ratón existe un aumento de la expresión de TET3 en las oASC, pero no existen diferencias en la expresión de TET3 en el humano. Cuando se analizó el efecto del pase de cultivo sobre las líneas celulares estudiadas se observó una disminución en la expresión de las tres proteínas de la familia TET a pases tardíos (p20) tanto en las cASCs como en las oASC y en ambos modelos, ratón y humano.

Dado que la expresión de la familia de proteínas de las TET resulta en la generación de los grupos 5hmC, se analizó la posible relación entre los niveles de expresión disminuidos y el enriquecimiento en grupos 5hmC del ADN en las ASC (pág. 71, material y métodos). Los resultados muestran una disminución en la hidroximetilación del ADN de las oASCs de ratón (figura 27 A) y de humano (figura 27 B). Cuando se analizan las diferencias con los pases del cultivo se observa un aumento en las cASC pero no en las oASC, en el modelo de ratón a pase tardío (figura

27 A). En el modelo humano se observa que el pase del cultivo no disminuye significativamente la cantidad de grupos 5hmC (figura 27 B).

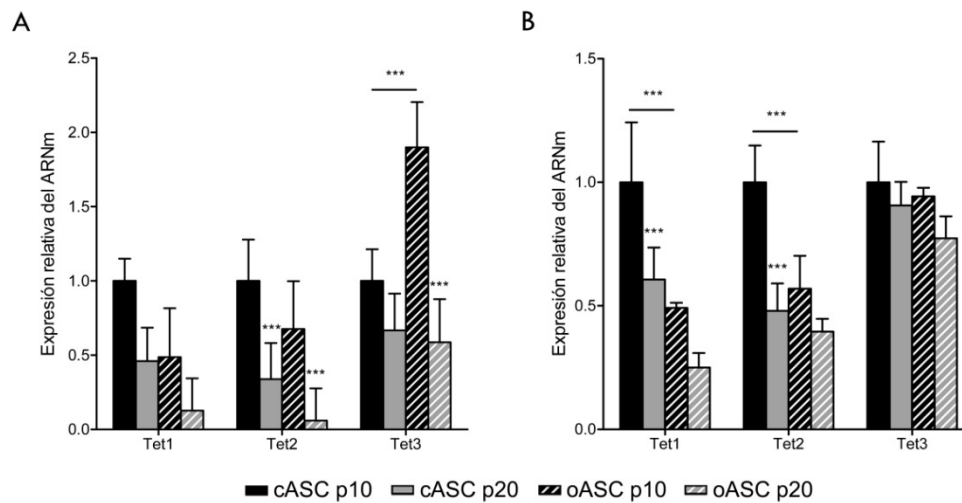


Figura 26. Análisis de la expresión relativa de la familia de proteínas TET. Cuantificación por RT-PCR a tiempo real de las ASC de ratón (A) y de humano (B) en condiciones normales de cultivo. Los resultados muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

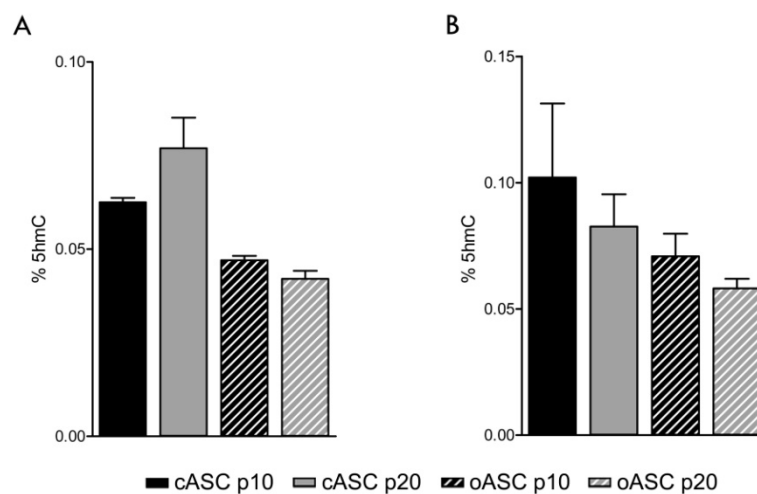


Figura 27. Cuantificación de la hidroximetilación del ADN en las ASC. Porcentaje de grupos 5-hidroximetilcitosina (5hmC) en ASC de ratón (A) y humano (B) y a diferente pase de cultivo. La cuantificación se llevó a cabo mediante la captura simple y detección por anticuerpo. Los resultados muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

7.2. La obesidad provoca una pérdida de la pluripotencia de las ASC durante el cultivo in vitro.

Con la finalidad de estudiar la capacidad de pluripotencia de las ASC en el cultivo in vitro, se verificó la expresión de los principales genes de pluripotencia; Nanog, Oct-4 y Sox-2. Sorprendentemente, las células provenientes de ambientes

obesos presentan una disminución en la expresión de este conjunto de genes en el modelo humano de cerca del 40% (figura 28 B), pero no en las células de ratón (figura 28 A). El análisis de la posible variación en la expresión de los genes con el pase del cultivo muestra, una disminución en la expresión en las cASC pero no en las oASC del modelo humano (figura 28 B). De nuevo no existen diferencias en el modelo de ratón (figura 28 A). Estos resultados sugieren que la pluripotencia de las células podría verse afectada por el ambiente en el que se encuentran las células.

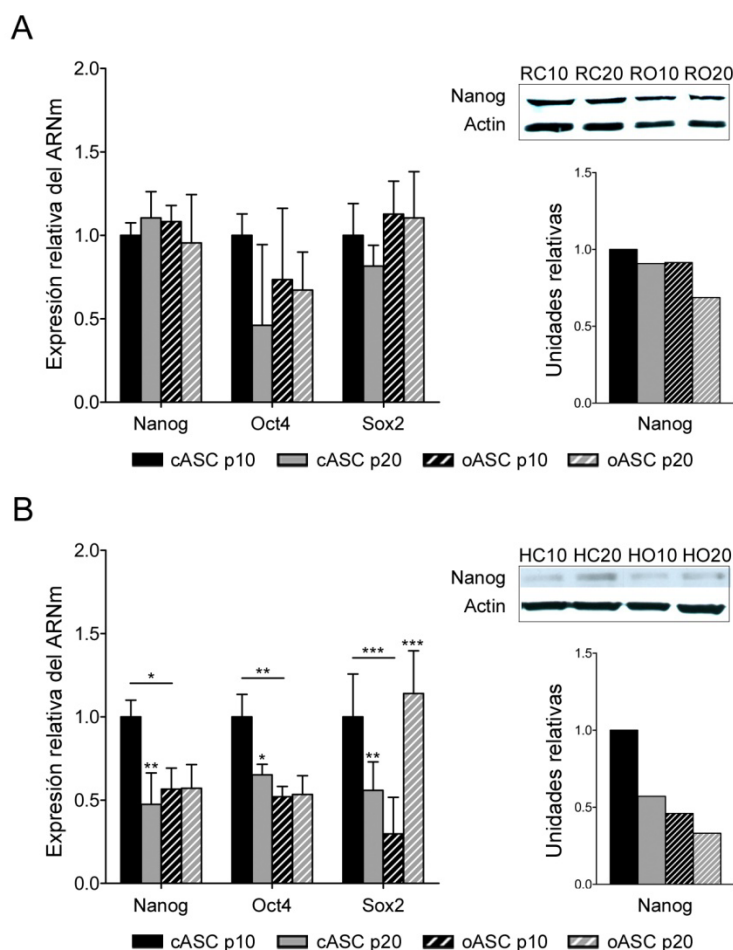


Figura 28. Análisis de los genes responsables del mantenimiento de la pluripotencia en las ASC.

Cuantificación de la expresión relativa de los genes *Nanog*, *Oct-4* y *Sox-2* mediante RT-PCR a tiempo real de las ASC de ratón (A) y de humano (B) a distinto pase de cultivo. Inmunodetección de la proteína *Nanog* en extractos celulares totales de las ASC. RC10, cASC p10de ratón; RC20, cASC p20de ratón; RO10, oASC p10 de ratón; RO20, oASC p20 de ratón; HC10, cASC p10de humano; HC20, cASC p20de humano; HO10, oASC p10 de humano; HO20, oASC p20 de humano. Los resultados muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Cuando se analizan los niveles de la proteína *Nanog* (figura 28, panel derecho), se observa que en el modelo humano, existe una reducción del 50% en los niveles de expresión de *Nanog* en oASC, así como una disminución similar con el pase del cultivo

tanto en controles como en obesas. Sorprendentemente aunque los niveles de expresión no varían en las células de ratón, la cantidad de Nanog en los extractos proteicos presenta una ligera disminución en las oASC, así como en el pase más tardío de cASC y oASC.

En conjunto, estos resultados sugieren que la obesidad disminuye la expresión de los genes responsables del mantenimiento de la pluripotencia debido a la disminución en la hidroximetilación del ADN en las oASC.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El desarrollo de terapias mediante el uso de células madre/troncales, se ha convertido en un enfoque terapéutico novedoso, diseñado para resolver el fallo en la reparación endógena por parte de los órganos dañados, bien por el desgaste de la edad o por la aparición de diversas patologías. Debido a las propiedades regenerativas que presentan las células mesenquimales, estas se han convertido en una de las principales herramientas utilizadas en terapias celulares para el tratamiento de multitud de enfermedades. Es de destacar que desde que se describió que el tejido adiposo contenía una población abundante y fácilmente accesible de células mesenquimales (Zuk et al., 2002), las ASC se han convertido en una fuente altamente atractiva de células para su uso en terapia celular (Gimble et al., 2007). Actualmente, las ASC ya se han utilizado en varios ensayos clínicos como fuente de células para la terapia celular (Gimble et al., 2012). Asimismo, se cree que las poblaciones de células mesenquimales endógenas son movilizadas en los tejidos circundantes o en la propia circulación para llegar a los tejidos dañados y ayudar así en la reparación tisular (Ito, 2011).

En la actualidad, el tejido adiposo es considerado no solo como órgano central del metabolismo energético y endocrino, sino que la percepción actual ha cambiado, y este tejido se ha convertido en una importante fuente de células madre. Con el aumento de la obesidad en la población mundial, alcanzando niveles del 30% en la población adulta estadounidense y europea (Berghofer et al., 2008, Flegal et al., 2012), se han incrementado las cirugías plásticas facilitándose la obtención de abundante tejido adiposo y con ello la accesibilidad para la obtención de gran cantidad de células mesenquimales.

Las células mesenquimales para su uso en terapias celulares, deben ser obtenidas en gran cantidad y a través de un procedimiento que lleve el menor tiempo posible, evitando la pérdida mínima de las propiedades de las células. Mediante la técnica del explante, el aislamiento de precursores de tejidos adultos es una forma rápida y sencilla a partir de la cual se puede obtener una gran cantidad de células en poco tiempo (Galvez et al., 2009, Bernal et al., 2012a). Sin embargo, durante el cultivo *in vitro* de las células mesenquimales, las condiciones ambientales del nicho celular son modificadas, ya que el crecimiento y mantenimiento de las células se realiza en un ambiente de normoxia, alterándose algunas propiedades importantes de la biología de las células (Rosova et al., 2008, Estrada et al., 2012). Se ha demostrado, que en condiciones de hipoxia, se incrementa la proliferación, la diferenciación y la migración

celular (Potier et al., 2007), funciones que son esenciales para su uso en la regeneración tisular.

Otro de los aspectos importantes que se han descrito en las poblaciones de células mesenquimales es el efecto negativo que tienen los factores de riesgo en las propiedades reparadoras de las células. De este modo, se ha observado que pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión o diabetes presentan una reducción en la capacidad de proliferación o migración en las células progenitoras endoteliales (Vasa et al., 2001, Tepper et al., 2002, Yang et al., 2010, Chen et al., 2004, Ramunni et al., 2010). Del mismo modo, se ha observado que la funcionalidad de las ASC se ve afectada por la edad, el género y el tipo de tejido adiposo del que procedan (Zhu et al., 2009, Efimenko et al., 2011). No obstante existen pocos estudios sobre el efecto que la obesidad tiene sobre la población de células progenitoras. Es por ello que en este trabajo se ha querido analizar el efecto que la obesidad tiene sobre la población de células mesenquimales residentes en el tejido adiposo, y que son utilizadas en diversos ensayos clínicos.

Los resultados muestran que las ASC procedentes de individuos con obesidad presentan una disminución en las diversas capacidades de estas células. Se ha observado que el número de clones de ASC, aislados mediante la técnica del explante, de ratones obesos (ob/ob) es significativamente inferior a los aislados en ratones no obesos (Galvez et al., 2009). Este estudio está relacionado con el estudio de Tchoukalova y col. en el que se reporta que los individuos obesos presentan una reducción en el número de preadipocitos (Tchoukalova et al., 2007). Estas observaciones indicarían, que la obesidad reduce la población de células mesenquimales residentes en el tejido adiposo de ratones con obesidad. Partiendo de esta premisa, se llevó a cabo un estudio de la viabilidad y funcionalidad de las ASC procedentes de ambientes obesos.

Los estudios realizados en esta tesis han revelado que tras el aislamiento de las células mediante la técnica del explante, se puede obtener una población de ASC cuyo fenotipo es similar, y cuya expresión es la de los marcadores característicos para este tipo celular (Rodeheffer et al., 2008, Perez et al., 2013b). Sin embargo, se ha demostrado que el potencial para un correcto funcionamiento depende del entorno donde residan. Las ASCs aisladas de un ambiente obeso, presentan una resistencia a la insulina y un fenotipo hiperplásico, limitando la capacidad de las células para generar adipocitos funcionales. Estos resultados indican que, aunque las ASC están presentes en los individuos con obesidad, su contribución a la homeostasis del tejido

adiposo se encuentra alterada, lo que conduce a un efecto perjudicial en el mantenimiento del tejido adiposo. Además, en contraste con las ASCs de individuos sanos, las ASCs de individuos obesos, presentan una alteración en la vía lipolítica. Curiosamente, la obesidad genera una deficiencia en la acumulación interna de lípidos y triglicéridos lo que explicaría la excesiva acumulación de lípidos en los tejidos no adiposos (lipotoxicidad) observada en pacientes obesos (Unger, 2002, Schaffer, 2003). En conjunto se pone de manifiesto que en condiciones de obesidad, la población de ASC no participan en el correcto funcionamiento del tejido adiposo.

En este estudio se ha observado una la alteración en los perfiles de secreción de adipoquinas en las ASC obtenidas de tejido de sujetos obesos. Mientras que los adipocitos derivados de las ASCs de individuos sanos presentan un aumento en la secreción de adiponectina y una disminución en la de MCP-1 y TNF- α , en los adipocitos derivados de oASCs se observa una respuesta inversa; altos niveles de MCP-1 y TNF- α y una reducción en la producción de adiponectina. De hecho, es conocido que las concentraciones plasmáticas elevadas de MCP-1 y TNF- α , se han detectado en pacientes obesos y diabéticos (Takahashi et al., 2003, Kern et al., 2001). Sorprendentemente, el medio condicionado de las cASCs no conducía a una restauración en la sensibilidad a la insulina de los adipocitos derivados de oASCs, lo que sugiere una señalización interna. La inducción del cambio fenotípico mediante el uso de fracciones sub-celulares de las cASCs transferidas a oASCs, confirman la hipótesis de una señalización interna alterada que conlleva la disfunción metabólica presente en las oASCs. Estos datos muestran que la fracción citosólica es capaz de restaurar la respuesta a la insulina, recuperándose los niveles normales de captación de glucosa, en los adipocitos derivados de las oASCs modificadas. Además se produce una restauración en la acumulación lipídica y en el perfil de secreción de adipoquinas cuando las oASCs son modificadas con fracciones citosólicas. Conjuntamente los datos indican que las ASC de individuos obesos presentan una alteración en el metabolismo, capaz de mejorar mediante transferencia citosólica de ASC de individuos sanos.

La obesidad tiene un efecto perjudicial en el metabolismo del tejido adiposo, lo que desencadena la aparición del síndrome metabólico en los individuos (Greenberg and Obin, 2006, Nishimura et al., 2009). En este trabajo se ha descrito la relación existente entre la obesidad y el cambio en el metabolismo de las células madre del tejido adiposo (Perez et al., 2013b). Cuando se analizan los posibles cambios metabólicos en las ASCs durante el cultivo de estas, se observa, que además de los

cambios existentes durante la diferenciación adipogénica, existe un aumento en la glucosa y el glutamato presente en el medio de cultivo de las ASC de individuos con obesidad. Estos datos confirman que la captación de glucosa está disminuida en células procedentes de ambientes obesos, existiendo cambios fundamentales en las vías energéticas de estas células. Además, el análisis metabólico intracelular demuestra que existen cambios significativos en los niveles de varios metabolitos en las ASCs de individuos obesos. Los resultados muestran que existe una disminución en los niveles de leucotrienos, quimiocina proinflamatoria (Osborn and Olefsky, 2012), así como en los niveles de creatinina, molécula antioxidante (Meyer et al., 2006). Conjuntamente estos datos demuestran la existencia de una alteración tanto en el metabolismo energético como en la producción de citoquinas, lo que confirmaría el desarrollo de una disfunción metabólica asociada a la obesidad. Se demuestra así que el ambiente obeso modula las propiedades *in vitro* de las ASC. De esta forma se ha visto que las ASC aisladas de sujetos obesos disminuyen de forma significativa la capacidad de diferenciación y los adipocitos derivados de las ASC de individuos obesos presentan un fenotipo hiperplásico, una disminución en acumulación lipídica y además desarrollan una resistencia a la insulina (Perez et al., 2013b) confirmando la disfunción metabólica asociada a la obesidad.

La regeneración tisular mediante el uso de células madre comprende una serie de propiedades que van desde el reconocimiento y la interacción con el endotelio microvascular, a la migración e invasión del tejido diana (Smart and Riley, 2008). Este proceso se basa en la interacción compleja entre las citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, y la matriz extracelular. Estudios previos han demostrado que las ASC presentan además potencial angiogénico debido a la secreción de diversos factores paracrinos (Sheng et al., 2011, Zhang et al., 2007) y proangiogénicos como el VEGF, HGF, IGF-1, TGF- β y MCP-1. Debido a estas propiedades, de migración, invasión y angiogénesis, las ASCs presentan un papel importante en la regeneración y revascularización de los tejidos (Nakagami et al., 2005). De este modo, se evaluó el efecto que tiene la obesidad en estas capacidades regenerativas, observándose que la capacidad de migración de las ASC se ve afectada por el medio ambiente obeso y que esta puede ser modificada mediante el tratamiento con diversas citoquinas. En comparación con las ASC de individuos no obesos, las células procedentes de un ambiente obeso, presentan menor capacidad migratoria en condiciones basales y la respuesta a las citoquinas es diferente en función de las líneas celulares y del modelo animal estudiado. En este caso las células humanas responden de forma similar a la estimulación con las diferentes citoquinas a diferencia de las células de ratón. Estos

resultados sugieren que el tratamiento con citoquinas específicas podría restaurar y mejorar los niveles en la migración de las ASC, aunque la respuesta varía en función del modelo animal estudiado.

Otro de los mecanismos importantes en el proceso de regeneración tisular que puede ser influenciado por la obesidad es la capacidad de invasión (Teo et al., 2012, Schmidt et al., 2006). Numerosos estudios *in vivo* han demostrado que las MSC tienen la capacidad de movilizarse en la sangre, cruzar la barrera endotelial y ser incorporados en los tejidos (Chamberlain et al., 2007, Schmidt et al., 2006). Por ello se estudió la capacidad de las ASC para cruzar la matriz e invadir el tejido. Sorprendentemente, a diferencia de la migración, la capacidad de invasión no se vio afectada por la obesidad en ninguno de los modelos, ratón y humano. La estimulación de la invasión mediante el uso de citoquinas incrementaba esta capacidad, aunque se observó un deterioro en la respuesta de las células procedentes de individuos obesos. Por último se ha descrito también, que las MSC pueden participar en la regeneración a través del efecto paracrino y de procesos angiogénicos (Efimenko et al., 2011, Oswald et al., 2004, Konno et al., 2010). Con este trabajo se pone de manifiesto que el potencial de las ASC para formar capilares después de la estimulación angiogénica, mediante matrices ricas en factores angiogénicos, se ve afectado por el ambiente obeso de procedencia. Conjuntamente los resultados del análisis de las propiedades regenerativas de las ASC muestran una pérdida en la capacidad de migrar, invadir y revascularizar un tejido, por lo que el uso de estas células en estrategias de terapias de implantación sería ineficiente cuando el nicho de origen implica un entorno de obesidad.

En este sentido, con los resultados se demuestra que el ambiente obeso disminuye la capacidad de diferenciación, de migración y el potencial angiogénico de las células de ambientes obesos (Perez et al., 2013a). Resultados que son consistentes con las diferencias en la tasa de crecimiento y el potencial adipogénico en función de la distribución anatómica del tejido adiposo (Baglioni et al., 2009) y la disminución de células madre observada en el tejido adiposo en pacientes obesos (Onate et al., 2012).

Al observar que la obesidad afecta a varias de las funciones principales de las células madre, se quiso analizar de qué manera la obesidad modifica otras propiedades importantes de las ASC y si la acumulación de diversos factores podría estar relacionada. De este modo se ha observado que las ASC derivadas de un ambiente obeso presentan un deterioro en su capacidad proliferativa, presentando una

menor tasa de proliferación *in vitro*. Se han observado además cambios en la morfología de las ASC, un aumento en el tamaño celular y la complejidad estructural, que se asocian al aumento de la apoptosis observado en los cultivos *in vitro* de estas células. Estos resultados indican que las ASC, derivadas del tejido adiposo de individuos obesos, muestran una pérdida en la homeostasis celular.

A pesar de que las ASC de individuos no obesos y obesos muestran marcadores de superficie similares, las principales alteraciones se pueden observar en las vías metabólicas. Curiosamente, se encontró que las ASC del tejido adiposo obeso, contienen una mayor cantidad de mitocondrias, asociada a una mayor producción de ROS. Se ha visto que la función de las mitocondrias es esencial para la biología de los adipocitos y la alteración generada por ROS puede estar vinculada a una alteración en la sensibilidad a la insulina (Kusminski and Scherer, 2012). Estos resultados están acompañados por el incremento observado en la apoptosis en los cultivos de las oASCs. Se observa que existe un aumento en la cantidad de mitocondrias y en los niveles de ROS, que son inversamente proporcionales a la proliferación del cultivo, pero que son directamente proporcionales a la apoptosis de las oASCs (Pintus et al., 2012). Por otro lado, aunque la cantidad de mitocondrias es mayor en las ASC de individuos obesos, se observa una reducción en el consumo de oxígeno en condiciones normales cuando las células utilizan la glucosa durante la glucólisis. Sin embargo, el consumo de oxígeno es mayor en las ASC de obesos cuando la fuente de energía son los ácidos grasos libres y llevan a cabo la β -oxidación. Por lo tanto la obesidad induce una alteración en la biogénesis mitocondrial y un aumento en la producción de ROS, lo que contribuye a los efectos de insulino-resistencia observados en estas células. En este trabajo se ha demostrado que las células disminuyen la capacidad de almacenamiento de lípidos y la producción de adipquinas, por lo que estos datos confirman la existencia de una disfunción metabólica generalizada.

Tras haber establecido el efecto de la obesidad en el metabolismo de las ASC, se estudió su posible relación con el envejecimiento (Ahima et al., 2000). Se ha estudiado la relación entre la obesidad y el estrés oxidativo y la inflamación, así como el impacto que produce sobre la longitud telomérica (Tzanetakou et al., 2012). Los resultados muestran una disminución en la longitud de los telómeros en ratones obesos, pero no existen diferencias significativas en el modelo humano, aunque ambos modelos sí presentan una disminución en la actividad de la telomerasa cuando las células proceden de ambientes obesos. Estos datos reflejan la inactivación de la

actividad telomerasa *in vitro* en las ASC de obesos, que conduce a una reducción en la longitud telomérica. Se sabe que el estrés oxidativo es un factor importante en el desarrollo del cultivo celular y la presencia de ROS en el cultivo determina la aparición de una senescencia prematura, lo que conlleva la activación de respuestas celulares específicas al daño en el ADN (von Zglinicki et al., 2001) o el acortamiento telomérico observado en el cultivo de las ASC. Se ha descrito que las proteínas relacionadas con el ciclo celular, tales como p53/p21, p16INK4A/Rb, y Pten/p27Kip1 están implicadas en la senescencia celular (Rosso et al., 2006, Wilson et al., 2010). Aunque en este estudio se observó un efecto en la proliferación y la apoptosis, no se ha podido detectar senescencia con el marcador histoquímico β -galactosidasa. Sin embargo, sí se encontró que la obesidad aumentaba la expresión de las proteínas p53 y p21, lo que podría explicar el incremento observado en la apoptosis. En contraste, los niveles de p16 no aumentaron, lo que sugiere que las ASC de individuos obesos presentan un incremento en la apoptosis durante el cultivo celular pero no en la senescencia.

La exposición del medio ambiente puede alterar la expresión de genes a través de modificaciones epigenéticas (Chia et al., 2011), como son las modificaciones del ADN por metilación e hidroximetilación, procesos que pueden regular la expresión génica en células madre embrionarias (Mohr et al., 2011). Durante el cultivo *in vitro* de las células madre, estas mantienen la capacidad de auto-renovación, por lo que el siguiente paso fue analizar si la obesidad podría modificar las propiedades de troncalidad (del inglés “*stemness*”) de estas células. En este trabajo se demuestra que existe una asociación entre la obesidad, los cambios epigenéticos y la pérdida de troncalidad de las ASC. Se observó que la obesidad disminuye los niveles de 5hmC, asociados a la disminución en la expresión de las enzimas responsables de llevar a cabo la hidroximetilación del ADN (Ito et al., 2010). Las ASCs de individuos con obesidad presentan una alteración en la expresión génica de dos de las proteínas encargadas de la hidroximetilación; TET1 y TET2, observándose una disminución en los niveles de expresión de estas enzimas con la obesidad. Por otro lado, el análisis de la troncalidad de las ASC, muestra que la alteración en el patrón de hidroximetilación está asociado a cambios en la expresión de los genes de pluripotencia (Tsai and Hung, 2012). Los resultados muestran que existe una disminución en los niveles de expresión de los genes Nanog, Oct4 y Sox2 en las ASCs de individuos obesos, así como una reducción en los niveles de la proteína Nanog. Por lo tanto se observa que los cambios en la hidroximetilación del ADN de las células obesas están asociados con cambios en la troncalidad de las células madre adultas. Asimismo, existe una correlación con el pase del cultivo de las ASCs, presentando una disminución en los

niveles de expresión de TET y en los niveles de hidroximetilación, seguidos por una pérdida de los marcadores de pluripotencia a medida que las células envejecen durante el mantenimiento *in vitro* del cultivo. De este modo, se confirma que tanto la obesidad como el envejecimiento producen una pérdida en la troncalidad de las ASCs.

En este trabajo se ha demostrado que la inflamación asociada a la obesidad, produce un cambio en el microambiente en el que se encuentran las células madre del tejido adiposo y que este cambio origina una alteración en las diferentes capacidades estudiadas de las ASCs. Estudios previos han demostrado que el factor de transcripción Hif1 α juega un papel clave en el desarrollo y la supervivencia celular, así como en el ciclo celular y el metabolismo de las células (Weidemann and Johnson, 2008). El análisis de la expresión y de los niveles de proteína Hif1 α en las células estudiadas muestra una reducción en las ASC de obesos, así como una disminución con los pases del cultivo *in vitro* de todas las líneas celulares estudiadas. Por lo tanto, en condiciones de cultivo (normoxia) las ASC de individuos obesos, que presentan una reducción de la capacidad de diferenciación, migración y angiogénesis, presentan también una pérdida en la cantidad de Hif1 α . Estos resultados sugieren que podría existir una correlación entre los niveles de Hif1 α , que se ven afectados tanto por la obesidad como por el envejecimiento del cultivo, y la pérdida de las diferentes capacidades funcionales analizadas en las ASCs.

De este modo, con el conjunto de resultados obtenidos, se propone el siguiente modelo explicativo del efecto del micro-ambiente sobre la funcionalidad celular (figura 29). En un ambiente obeso el aumento en la liberación de distintos factores como resultado del estado inflamatorio asociado a la obesidad, conlleva un estrés oxidativo que tiene efectos perjudiciales en la población residente de las ASCs. En condiciones de obesidad existe una mayor cantidad de mitocondrias en las oASC, y un incremento asociado en la cantidad de ROS producido durante el cultivo de las células. Este incremento en la producción de ROS lleva asociado un acortamiento telomérico, existiendo además un efecto sobre el estado de hidroximetilación del ADN de las oASC, asociado a una disminución en la capacidad multipotente y de auto-renovación de estas células. Asimismo, el efecto del ambiente obeso, no solo produce una alteración cromosómica, sino que existe una alteración en los niveles de p21 y p53 asociados a un incremento en el cultivo celular de la apoptosis (muerte celular) debido a la alteración en las vías de prevención y respuesta al daño en el ADN. Por otro lado el metabolismo respiratorio también se encuentra alterado, ya que las mitocondrias de las células obesas, son capaces de utilizar mejor los ácidos grasos y

peor la glucosa como fuente de carbono durante el proceso de respiración. Finalmente, los niveles aumentados de glucosa en el medio extracelular, junto a la disminución en la captación de glucosa por parte de las oASC, confirman que las ASCs en ambientes obesos presentan un fenotipo insulino-resistente. La disminución en los niveles del factor de transcripción Hif1 α , podrían estar relacionados, con la pérdida de las capacidades regenerativas en este tipo de células, se observa una reducción en la respuesta migratoria, proliferativa y angiogénica de las células procedentes de ambientes obesos. Por lo tanto las en los individuos obesos las ASC presentan una alteración generalizada en la función metabólica y funcional.

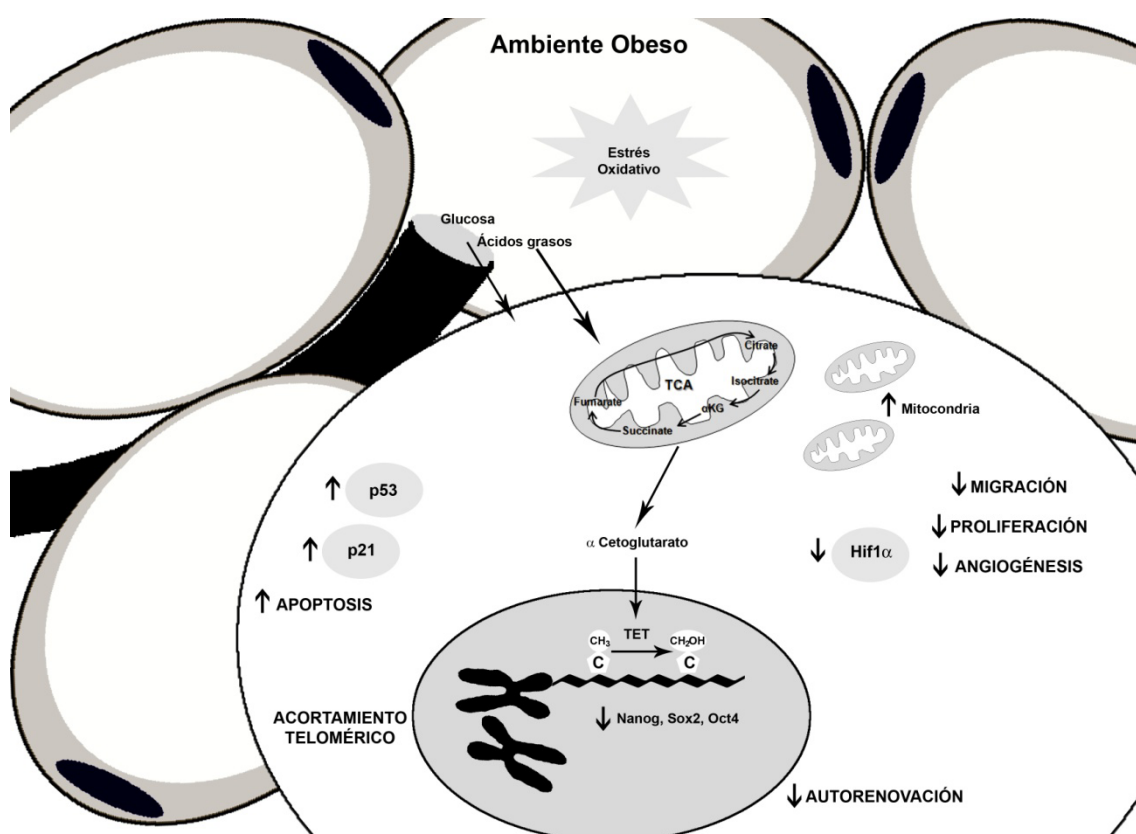


Figura29. Estado alterado generalizado de la función celular en las ASCs de individuos obesos.
Modelo explicativo del efecto de la obesidad sobre el metabolismo y la funcionalidad de las ASCs.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la obesidad promueve el desarrollo de un ambiente perjudicial para las ASC. Estos efectos influyen de forma negativa a la capacidad regenerativa de las células madre, tanto para llevar a cabo las funciones de mantenimiento del tejido como del organismo. Además los resultados obtenidos indican que las propiedades de las ASC, que las hacen propicias para su uso en terapias celulares y que son tan ampliamente

utilizadas en ensayos clínicos, están alteradas, por lo que su uso podría no resultar en el éxito deseado cuando son usadas en pacientes. Aunque en nuestro trabajo proponemos un método para revertir el efecto mediante la transferencia citosólica, los cambios no son permanentes y no se consigue obtener una recuperación total a nivel de las células control. Por lo tanto es interesante conocer la fuente de obtención de las células utilizadas en terapia celular. Además son necesarias futuras investigaciones para determinar si las modificaciones observadas en las células madre del tejido adiposo son extrapoladas al nicho original productor de las células mesenquimales. Del mismo modo son necesarios estudios sobre los posibles cambios que puedan tener lugar en las células de individuos con pérdidas de peso, donde podría darse una recuperación de las propiedades funcionales de estas células tras la restauración de las características normales del nicho celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados en esta tesis podemos concluir que:

1. Las ASC procedentes de individuos obesos y no obesos presentan los mismos marcadores de superficie, por lo que las poblaciones aisladas son fenotípicamente iguales.
2. La capacidad de las ASC para diferenciarse en adipocitos funcionales se ve afectada por el ambiente obeso, dando lugar a adipocitos con una función metabólica alterada; presentan un fenotipo insulino-resistente y una alteración en los patrones de secreción de citoquinas.
3. La modificación de las oASC mediante transferencia citosólica de células control restaura la función metabólica.
4. La obesidad afecta negativamente a la capacidad de regeneración de las ASC, presentando una reducción en la migración, invasión y angiogénesis. Además, el envejecimiento del cultivo disminuye estas capacidades.
5. Las ASCs derivadas de individuos con obesidad presentan una menor tasa de proliferación *in vitro* que las de no obesos, así como un aumento en la apoptosis celular del cultivo y un incremento en el tamaño celular disminuyendo por lo tanto la viabilidad de las células obesas *in vitro*.
6. Existe un incremento en la cantidad de mitocondrias, asociado a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno en estas células durante el cultivo *in vitro*. De este modo, el ambiente obeso afecta negativamente al ADN promoviendo un acortamiento telomérico, que desencadena en un aumento de la apoptosis celular.
7. Las ASC obesas, presentan un mayor consumo de oxígeno cuando son forzadas a llevar a cabo la β -oxidación, y un menor consumo de oxígeno en la glucólisis.
8. Las ASC aisladas de individuos con obesidad pierden las propiedades características de las células madre: son menos pluripotentes y auto-renovables.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AHIMA, R. S., SAPER, C. B., FLIER, J. S. & ELMQUIST, J. K. 2000. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 21, 263-307.
- ALLISON, D. B. & HESHKA, S. 1993. Toward an empirically derived typology of obese persons: derivation in a nonclinical sample. *Int J Eat Disord*, 13, 93-108.
- BAGLIONI, S., FRANICALANCI, M., SQUECCO, R., LOMBARDI, A., CANTINI, G., ANGELI, R., GELMINI, S., GUASTI, D., BENVENUTI, S., ANNUNZIATO, F., BANI, D., LIOTTA, F., FRANCINI, F., PERIGLI, G., SERIO, M. & LUCONI, M. 2009. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J*, 23, 3494-505.
- BALISTRERI, C. R., CARUSO, C. & CANDORE, G. 2010. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, 2010, 802078.
- BERGHOFER, A., PISCHON, T., REINHOLD, T., APOVIAN, C. M., SHARMA, A. M. & WILLICH, S. N. 2008. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health*, 8, 200.
- BERNAL, A., FERNANDEZ, M., PEREZ, L. M., SAN MARTIN, N. & GALVEZ, B. G. 2012a. Method for obtaining committed adult mesenchymal precursors from skin and lung tissue. *PLoS One*, 7, e53215.
- BERNAL, A., SAN MARTIN, N., FERNANDEZ, M., COVARELLO, D., MOLLA, F., SOLDI, A., LATINI, R., COSSU, G. & GALVEZ, B. G. 2012b. L-selectin and SDF-1 enhance the migration of mouse and human cardiac mesoangioblasts. *Cell Death Differ*, 19, 345-55.
- BLACKBURN, E. H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350, 569-73.
- CALLE, E. E. & THUN, M. J. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene*, 23, 6365-6378.
- CANUTO, G. A., CASTILHO-MARTINS, E. A., TAVARES, M. F., RIVAS, L., BARBAS, C. & LOPEZ-GONZALVEZ, A. 2014. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in Leishmania. *Anal Bioanal Chem*, 406, 3459-76.
- CAO, Y. 2013. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab*, 18, 478-89.
- CAWTHORN, W. P., SCHELLER, E. L. & MACDOUGALD, O. A. 2012a. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *Journal of Lipid Research*, 53, 227-246.

- CAWTHORN, W. P., SCHELLER, E. L. & MACDOUGALD, O. A. 2012b. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, 53, 227-46.
- CRISTANCHO, A. G. & LAZAR, M. A. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 722-34.
- CROSSNO, J. T., JR., MAJKA, S. M., GRAZIA, T., GILL, R. G. & KLEMM, D. J. 2006. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest*, 116, 3220-8.
- CROWLEY, V. E., YEO, G. S. & O'RAHILLY, S. 2002. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 276-86.
- CUNNINGHAM, M. J., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*, 60, 216-22.
- CHAMBERLAIN, G., FOX, J., ASHTON, B. & MIDDLETON, J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, 2739-49.
- CHEN, J. Z., ZHANG, F. R., TAO, Q. M., WANG, X. X., ZHU, J. H. & ZHU, J. H. 2004. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*, 107, 273-80.
- CHEN, Q., FISCHER, A., REAGAN, J. D., YAN, L. J. & AMES, B. N. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4337-41.
- CHIA, N., WANG, L., LU, X., SENUT, M. C., BRENNER, C. & RUDEN, D. M. 2011. Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics*, 6, 853-6.
- DANCHAKOFF, V. 1916. The Differentiation of Cells as a Criterion for Cell Identification, Considered in Relation to the Small Cortical Cells of the Thymus. *J Exp Med*, 24, 87-105.
- DI BONZO, L. V., FERRERO, I., CRAVANZOLA, C., MARESCHI, K., RUSTICHELL, D., NOVO, E., SANAVIO, F., CANNITO, S., ZAMARA, E. & BERTERO, M. 2008. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*, 57, 223-231.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.

- EFIMENKO, A., STAROSTINA, E., KALININA, N. & STOLZING, A. 2011. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med*, 9, 10.
- ESTRADA, J. C., ALBO, C., BENGURIA, A., DOPAZO, A., LOPEZ-ROMERO, P., CARRERA-QUINTANAR, L., ROCHE, E., CLEMENTE, E. P., ENRIQUEZ, J. A., BERNAD, A. & SAMPER, E. 2012. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ*, 19, 743-55.
- FADINI, G. P., DE KREUTZENBERG, S. V., CORACINA, A., BAESSO, I., AGOSTINI, C., TIENGO, A. & AVOGARO, A. 2006. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J*, 27, 2247-55.
- FELSON, D. T., ANDERSON, J. J., NAIMARK, A., WALKER, A. M. & MEENAN, R. F. 1988. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med*, 109, 18-24.
- FIBBE, W. E., NAUTA, A. J. & ROELOFS, H. 2007. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1106, 272-8.
- FLEGAL, K. M., CARROLL, M. D., KIT, B. K. & OGDEN, C. L. 2012. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*, 307, 491-7.
- FREEDLAND, E. S. 2004. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 1, 12.
- FRIEDL, G., WINDHAGER, R., SCHMIDT, H. & AIGNER, R. 2009. The osteogenic response of undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) to mechanical strain is inversely related to body mass index of the donor. *Acta Orthop*, 80, 491-8.
- GALVEZ, B. G., SAN MARTIN, N. & RODRIGUEZ, C. 2009. TNF-alpha is required for the attraction of mesenchymal precursors to white adipose tissue in Ob/ob mice. *PLoS One*, 4, e4444.
- GALLE, J., BADER, A., HEPP, P., GRILL, W., FUCHS, B., KAS, J. A., KRINNER, A., MARQUASS, B., MULLER, K., SCHILLER, J., SCHULZ, R. M., VON BUTTLAR, M., VON DER BURG, E., ZSCHARNACK, M. & LOFFLER, M. 2010. Mesenchymal stem cells in cartilage repair: state of the art and methods to monitor cell growth, differentiation and cartilage regeneration. *Curr Med Chem*, 17, 2274-91.
- GESTA, S., TSENG, Y. H. & KAHN, C. R. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131, 242-56.

- GHANNAM, S., BOUFFI, C., DJOUAD, F., JORGENSEN, C. & NOEL, D. 2010. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*, 1, 2.
- GIMBLE, J. M., BUNNELL, B. A. & GUILAK, F. 2012. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med*, 7, 225-35.
- GIMBLE, J. M., KATZ, A. J. & BUNNELL, B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100, 1249-60.
- GOMEZ-HERNANDEZ, A., PERDOMO, L., ESCRIBANO, O. & BENITO, M. 2013. [Role of brown and perivascular adipose tissue in vascular complications due to obesity]. *Clin Investig Arterioscler*, 25, 36-44.
- GREENBERG, A. S. & OBIN, M. S. 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr*, 83, 461S-465S.
- GUILHERME, A., VIRBASIU, J. V., PURI, V. & CZECH, M. P. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 367-77.
- HAMED, S., BRENNER, B. & ROGUIN, A. 2011. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. *Cardiovasc Res*, 91, 9-15.
- HARLEY, C. B., FUTCHER, A. B. & GREIDER, C. W. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-60.
- HARMS, M. & SEALE, P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19, 1252-1263.
- HOETZER, G. L., VAN GUILDER, G. P., IRMIGER, H. M., KEITH, R. S., STAUFFER, B. L. & DESOUZA, C. A. 2007. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol (1985)*, 102, 847-52.
- IBRAHIM, M. M. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, 11, 11-8.
- ITO, H. 2011. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol*, 21, 113-21.
- ITO, S., D'ALESSIO, A. C., TARANOVA, O. V., HONG, K., SOWERS, L. C. & ZHANG, Y. 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466, 1129-33.
- JAWORSKI, K., SARKADI-NAGY, E., DUNCAN, R. E., AHMADIAN, M. & SUL, H. S. 2007. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G1-4.

- JIANG, C., QU, A., MATSUBARA, T., CHANTURIYA, T., JOU, W., GAVRILOVA, O., SHAH, Y. M. & GONZALEZ, F. J. 2011. Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*, 60, 2484-95.
- JO, J., GAVRILOVA, O., PACK, S., JOU, W., MULLEN, S., SUMNER, A. E., CUSHMAN, S. W. & PERIWAL, V. 2009. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol*, 5, e1000324.
- JONES, B. H., STANDRIDGE, M. K. & MOUSTAID, N. 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*, 138, 1512-9.
- KARELIS, A. D., FARAJ, M., BASTARD, J. P., ST-PIERRE, D. H., BROCHU, M., PRUD'HOMME, D. & RABASA-LHORET, R. 2005. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 4145-50.
- KERN, P. A., RANGANATHAN, S., LI, C., WOOD, L. & RANGANATHAN, G. 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E745-51.
- KERSHAW, E. E. & FLIER, J. S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2548-56.
- KEYS, A., FIDANZA, F., KARVONEN, M. J., KIMURA, N. & TAYLOR, H. L. 1972. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis*, 25, 329-43.
- KOLF, C. M., CHO, E. & TUAN, R. S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9, 204.
- KONNO, M., HAMAZAKI, T. S., FUKUDA, S., TOKUHARA, M., UCHIYAMA, H., OKAZAWA, H., OKOCHI, H. & ASASHIMA, M. 2010. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 400, 461-5.
- KUSMINSKI, C. M. & SCHERER, P. E. 2012. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab*, 23, 435-43.
- LAVIE, C. J., MILANI, R. V. & VENTURA, H. O. 2009. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*, 53, 1925-32.
- LÓPEZ-JIMÉNEZ, F. & CORTÉS-BERGODERI, M. 2011. Obesidad y corazón. *Revista Española de Cardiología*, 64, 140-149.
- LYON, C. J., LAW, R. E. & HSUEH, W. A. 2003. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*, 144, 2195-200.

- MACENEANEY, O. J., KUSHNER, E. J., VAN GUILDER, G. P., GREINER, J. J., STAUFFER, B. L. & DESOUZA, C. A. 2009. Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults. *Int J Obes (Lond)*, 33, 219-25.
- MAEDA, N., FUNAHASHI, T. & SHIMOMURA, I. 2008. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4, 627-34.
- MANSILLA, E., DIAZ AQUINO, V., ZAMBON, D., MARIN, G. H., MARTIRE, K., ROQUE, G., ICHIM, T., RIORDAN, N. H., PATEL, A., STURLA, F., LARSEN, G., SPRETZ, R., NUNEZ, L., SORATTI, C., IBAR, R., VAN LEEUWEN, M., TAU, J. M., DRAGO, H. & MACEIRA, A. 2011. Could metabolic syndrome, lipodystrophy, and aging be mesenchymal stem cell exhaustion syndromes? *Stem Cells Int*, 2011, 943216.
- MEYER, L. E., MACHADO, L. B., SANTIAGO, A. P., DA-SILVA, W. S., DE FELICE, F. G., HOLUB, O., OLIVEIRA, M. F. & GALINA, A. 2006. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem*, 281, 37361-71.
- MIZUNO, H., TOBITA, M. & UYSAL, A. C. 2012. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30, 804-10.
- MOHR, F., DOHNER, K., BUSKE, C. & RAWAT, V. P. 2011. TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp Hematol*, 39, 272-81.
- MOKDAD, A. H., FORD, E. S., BOWMAN, B. A., DIETZ, W. H., VINICOR, F., BALES, V. S. & MARKS, J. S. 2003. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*, 289, 76-9.
- MORENO, L., MORAL-SANZ, J., MORALES-CANO, D., BARREIRA, B., MORENO, E., FERRARINI, A., PANDOLFI, R., RUPEREZ, F. J., CORTIJO, J., SANCHEZ-LUNA, M., VILLAMOR, E., PEREZ-VIZCAINO, F. & COGOLLUDO, A. 2014. Ceramide mediates acute oxygen sensing in vascular tissues. *Antioxid Redox Signal*, 20, 1-14.
- NAIR, S., LEE, Y. H., ROUSSEAU, E., CAM, M., TATARANNI, P. A., BAIER, L. J., BOGARDUS, C. & PERMANA, P. A. 2005. Increased expression of inflammation-related genes in cultured preadipocytes/stromal vascular cells from obese compared with non-obese Pima Indians. *Diabetologia*, 48, 1784-8.

- NAKAGAMI, H., MAEDA, K., MORISHITA, R., IGUCHI, S., NISHIKAWA, T., TAKAMI, Y., KIKUCHI, Y., SAITO, Y., TAMAI, K., OGIHARA, T. & KANEDA, Y. 2005. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2542-7.
- NIELSEN, P. E. 2001. Targeting double stranded DNA with peptide nucleic acid (PNA). *Curr Med Chem*, 8, 545-50.
- NIETO-VAZQUEZ, I., FERNÁNDEZ-VELEDO, S., KRÄMER, D. K., VILA-BEDMAR, R., GARCIA-GUERRA, L. & LORENZO, M. 2008. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 114, 183-194.
- NISHIMURA, S., MANABE, I. & NAGAI, R. 2009. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov Med*, 8, 55-60.
- ONATE, B., VILAHUR, G., FERRER-LORENTE, R., YBARRA, J., DIEZ-CABALLERO, A., BALLESTA-LOPEZ, C., MOSCATIELLO, F., HERRERO, J. & BADIMON, L. 2012. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J*, 26, 4327-36.
- OSBORN, O. & OLEFSKY, J. M. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*, 18, 363-74.
- OSWALD, J., BOXBERGER, S., JORGENSEN, B., FELDMANN, S., EHNINGER, G., BORNHAUSER, M. & WERNER, C. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22, 377-84.
- OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J. & WALSH, K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 85-97.
- PANENI, F., COSTANTINO, S. & COSENTINO, F. 2014. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep*, 16, 419.
- PENN, M. S., DONG, F., KLEIN, S. & MAYORGA, M. E. 2011. Stem cells for myocardial regeneration. *Clin Pharmacol Ther*, 90, 499-501.
- PEREZ, L. M., BERNAL, A., SAN MARTIN, N. & GALVEZ, B. G. 2013a. Obese-derived ASCs show impaired migration and angiogenesis properties. *Arch Physiol Biochem*, 119, 195-201.
- PEREZ, L. M., BERNAL, A., SAN MARTIN, N., LORENZO, M., FERNANDEZ-VELEDO, S. & GALVEZ, B. G. 2013b. Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by Lin28/Let7 pathway. *Diabetes*, 62, 2368-79.
- PIERANTOZZI, E., GAVA, B., MANINI, I., ROVIELLO, F., MAROTTA, G., CHIAVARELLI, M. & SORRENTINO, V. 2011. Pluripotency regulators in human

- mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev*, 20, 915-23.
- PINTUS, F., FLORIS, G. & RUFINI, A. 2012. Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY)*, 4, 734-41.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- POIRIER, P. & ECKEL, R. 2002. Obesity and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 4, 448-453.
- POTIER, E., FERREIRA, E., ANDRIAMANALIJAONA, R., PUJOL, J. P., OUDINA, K., LOGEART-AVRAMOGLOU, D. & PETITE, H. 2007. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone*, 40, 1078-87.
- RAJALA, M. W. & SCHERER, P. E. 2003. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 144, 3765-73.
- RAMUNNI, A., BRESCIA, P., DAMBRA, P., CAPUZZIMATI, L., RIA, R., DE TULLIO, G., RESTA, F., RUSSI, G., VACCA, A. & CORATELLI, P. 2010. Effect of low-density lipoprotein apheresis on circulating endothelial progenitor cells in familial hypercholesterolemia. *Blood Purif*, 29, 383-9.
- RODEHEFFER, M. S., BIRSOY, K. & FRIEDMAN, J. M. 2008. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*, 135, 240-9.
- ROLDAN, M., MACIAS-GONZALEZ, M., GARCIA, R., TINAHONES, F. J. & MARTIN, M. 2011. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. *FASEB J*, 25, 4111-26.
- ROMACHO, T., ELSSEN, M., ROHRBORN, D. & ECKEL, J. 2014. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf)*, 210, 733-53.
- ROSOVA, I., DAO, M., CAPOCCIA, B., LINK, D. & NOLTA, J. A. 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, 2173-82.
- ROSSO, A., BALSAMO, A., GAMBINO, R., DENTELLI, P., FALCIONI, R., CASSADER, M., PEGORARO, L., PAGANO, G. & BRIZZI, M. F. 2006. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem*, 281, 4339-47.
- RUDERMAN, N., CHISHOLM, D., PI-SUNYER, X. & SCHNEIDER, S. 1998. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*, 47, 699-713.

- SCADDEN, D. T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441, 1075-1079.
- SCHAFFER, J. E. 2003. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*, 14, 281-7.
- SCHIPPER, H. S., RAKHSHANDEHROO, M., VAN DE GRAAF, S. F., VENKEN, K., KOPPEN, A., STIENSTRA, R., PROP, S., MEERDING, J., HAMERS, N., BESRA, G., BOON, L., NIEUWENHUIS, E. E., ELEWAUT, D., PRAKKEN, B., KERSTEN, S., BOES, M. & KALKHOVEN, E. 2012. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J Clin Invest*, 122, 3343-54.
- SCHMIDT, A., LADAGE, D., STEINGEN, C., BRIXIUS, K., SCHINKOTHE, T., KLINZ, F. J., SCHWINGER, R. H., MEHLHORN, U. & BLOCH, W. 2006. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol*, 85, 1179-88.
- SHEEHAN, M. T. & JENSEN, M. D. 2000. Metabolic complications of obesity. Pathophysiologic considerations. *Med Clin North Am*, 84, 363-85, vi.
- SHENG, L., YANG, M., LI, H., DU, Z., YANG, Y. & LI, Q. 2011. Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *Tohoku J Exp Med*, 224, 229-34.
- SILVA, F. J., HOLT, D. J., VARGAS, V., YOCKMAN, J., BOUDINA, S., ATKINSON, D., GRAINGER, D. W., REVELO, M. P., SHERMAN, W., BULL, D. A. & PATEL, A. N. 2014. Metabolically active human brown adipose tissue derived stem cells. *Stem Cells*, 32, 572-81.
- SKURK, T., ALBERTI-HUBER, C., HERDER, C. & HAUNER, H. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1023-33.
- SMART, N. & RILEY, P. R. 2008. The stem cell movement. *Circ Res*, 102, 1155-68.
- SPALDING, K. L., ARNER, E., WESTERMARK, P. O., BERNARD, S., BUCHHOLZ, B. A., BERGMANN, O., BLOMQVIST, L., HOFFSTEDT, J., NASLUND, E., BRITTON, T., CONCHA, H., HASSAN, M., RYDEN, M., FRISEN, J. & ARNER, P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453, 783-7.
- SPIEGELMAN, B. M. & FLIER, J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104, 531-43.
- STOLZING, A., BAUER, E. & SCUTT, A. 2012. Suspension cultures of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level. *Stem Cells Dev*, 21, 2718-23.
- TAKAHASHI, K., MIZUARAI, S., ARAKI, H., MASHIKO, S., ISHIHARA, A., KANATANI, A., ITADANI, H. & KOTANI, H. 2003. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels

- leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem*, 278, 46654-60.
- TANG, W., ZEVE, D., SUH, J. M., BOSNAKOVSKI, D., KYBA, M., HAMMER, R. E., TALLQUIST, M. D. & GRAFF, J. M. 2008. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, 322, 583-6.
- TCHOUKALOVA, Y., KOUTSARI, C. & JENSEN, M. 2007. Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity. *Diabetologia*, 50, 151-7.
- TEO, G. S., ANKRUM, J. A., MARTINELLI, R., BOETTO, S. E., SIMMS, K., SCIUTO, T. E., DVORAK, A. M., KARP, J. M. & CARMAN, C. V. 2012. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*, 30, 2472-86.
- TEPPER, O. M., GALIANO, R. D., CAPLA, J. M., KALKA, C., GAGNE, P. J., JACOBOWITZ, G. R., LEVINE, J. P. & GURTNER, G. C. 2002. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 106, 2781-6.
- TILL, J. E. & MC, C. E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-22.
- TRAYHURN, P. & WOOD, I. S. 2005. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans*, 33, 1078-81.
- TSAI, C. C. & HUNG, S. C. 2012. Functional roles of pluripotency transcription factors in mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*, 11, 3711-2.
- TZANETAKOU, I. P., KATSILAMBROS, N. L., BENETOS, A., MIKHAILIDIS, D. P. & PERREA, D. N. 2012. "Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Res Rev*, 11, 220-9.
- UNGER, R. H. 2002. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53, 319-36.
- VAN GAAL, L. F., MERTENS, I. L. & DE BLOCK, C. E. 2006. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444, 875-880.
- VAN HARMELEN, V., ROHRIG, K. & HAUNER, H. 2004. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*, 53, 632-7.
- VASA, M., FICHTLSCHERER, S., AICHER, A., ADLER, K., URBICH, C., MARTIN, H., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89, E1-7.

- VON ZGLINICKI, T., BURKLE, A. & KIRKWOOD, T. B. 2001. Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol*, 36, 1049-62.
- WAGNER, W., HORN, P., CASTOLDI, M., DIEHLMANN, A., BORK, S., SAFFRICH, R., BENES, V., BLAKE, J., PFISTER, S., ECKSTEIN, V. & HO, A. D. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*, 3, e2213.
- WANG, S., SONI, K. G., SEMACHE, M., CASAVANT, S., FORTIER, M., PAN, L. & MITCHELL, G. A. 2008. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab*, 95, 117-26.
- WEIDEMANN, A. & JOHNSON, R. S. 2008. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*, 15, 621-7.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1796-808.
- WELLEN, K. E. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1785-8.
- WILSON, A., SHEHADEH, L. A., YU, H. & WEBSTER, K. A. 2010. Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, 11, 229.
- XU, X., DUAN, S., YI, F., OCAMPO, A., LIU, G. H. & IZPISUA BELMONTE, J. C. 2013. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab*, 18, 325-32.
- YANG, Z., CHEN, L., SU, C., XIA, W. H., WANG, Y., WANG, J. M., CHEN, F., ZHANG, Y. Y., WU, F., XU, S. Y., ZHANG, X. L. & TAO, J. 2010. Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 32, 444-52.
- ZHANG, D. Z., GAI, L. Y., LIU, H. W., JIN, Q. H., HUANG, J. H. & ZHU, X. Y. 2007. Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*, 120, 300-7.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-32.
- ZHU, M., KOHAN, E., BRADLEY, J., HEDRICK, M., BENHAIM, P. & ZUK, P. 2009. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 3, 290-301.
- ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P. & HEDRICK, M. H. 2002.

Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-95.

ANEXOS

ANEXO 1

Artículos publicados como resultado del proyecto de Tesis Doctoral

- Pérez, L.M., Bernal, A., San Martín, N. &Gálvez, B. G. 2013. Obese-derived ASCs show impaired migration and angiogenesis properties. Arch Physiol Biochem, 119, 195-201.
- Pérez L. M., Bernal, A., San Martín, N., Lorenzo, M., Fernandez-Veledo, S. &Gálvez, B. G. 2013. Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by Lin28/Let7 pathway. Diabetes, 62, 2368-79.

Artículos publicados durante el periodo de experimentación

- Bernal, A., Fernández, M., Pérez, L. M., San Martín, N. & Gálvez, B. G. 2012. Method for obtaining committed adult mesenchymal precursors from skin and lung tissue. *PLoS One*, 7, e53215.

